

Differentielle Expression von HLA-DRB-Genen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biochemiker Dipl.- Oec. Christian Heldt
28.06.1970 in Bremen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. J. Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. B. Ronacher

Gutachter: 1. Prof. Dr. W. Lockau
 2. PD Dr. B. Müller
 3. Prof. Dr. A. Radbruch

eingereicht: 17.04.2002

Datum der Promotion: 17.07.2002

Abstract

In den humanen Leukozyten-Antigenen (HLA) wird die wichtigste genetische Ursache von rheumatoider Arthritis gesehen. Es wurden bisher mehrere Mechanismen beschrieben, wie diese HLA-Moleküle die Entstehung und den Verlauf der Erkrankung beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die differentielle Expression von HLA-DRB-Genen in unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen als möglicher Mechanismus untersucht. Dabei wurden strukturelle Unterschiede zwischen den Promotoren des krankheitsassoziierten HLA-DR4-Haplotyps und den neutralen Haplotypen DR7 und DR9 eingehender betrachtet. Allen drei Haplotypen ist gemein, daß sie das DRB4-Gen als zweites funktionelles DRB-Gen tragen, wobei das DRB4-Gen entweder den DRB4A oder den -B-Promotor besitzt. Um den Einfluß einzelner Promotorelemente auf die mit dem Luziferase-Assay bestimmten Transkriptionsaktivitäten näher zu untersuchen, wurde mit Hilfe der surface plasmon resonance die Bindung der Transkriptionsfaktoren aus den Zellkernlysaten von der humanen Monozytenzelllinie THP-1 und von der humanen B-Lymphom-Zelllinie BJAB an die unterschiedlichen S-, X-, Y-, CCAAT- und TATA-Boxen analysiert. Es konnte gezeigt werden, daß die unterschiedliche Expression von DRB4A und DRB4B durch die ubiquitäre TATA-Box vermittelt wird. Dagegen wurde die INF- γ -Stimulation der HLA-DR-Expression von THP-1- aber auch von BJAB-Zellen durch die für die HLA-DR-Promotoren spezifische X-Box vermittelt. Bei der Analyse von DR4-, DR7- und DR9-positiven Patienten einer bereits gut charakterisierten RA-Kohorte stellte sich heraus, daß der DRB4B-Promotor, welcher im Vergleich zu DRB4A eine höhere transkriptionelle Aktivität besitzt, mit einem schweren Krankheitsverlauf assoziiert ist, so daß eine erhöhte HLA-DR-Expression den Krankheitsverlauf negativ zu beeinflussen scheint.

Differentielle Expression

HLA

MHC

Humane Leukozyten-Antigene

Haupthistokompatibilitäts-Antigene

Rheumatoide Arthritis

Abstract

Disease associated human leukocyte antigen (HLA) genes have been identified in humans where they are assumed to promote the susceptibility and/or progression of rheumatoid arthritis. Several mechanisms have been described how these HLA haplotypes impact on the disease. Among them the differential expression of HLA-DRB molecules in different types of antigen-presenting cells, which was investigated here in detail. The promoters of the disease associated HLA-DR4 to the neutral DR7 and DR9 haplotypes were analyzed for sequence polymorphisms resulting in functional differences. All three haplotypes carry as a second functional DRB gene the DRB4 gene, which is regulated by the DRB4A or –B promoter. To determine the impact of the promoter elements on the transcriptional activities measured by luciferase assay the surface plasmon resonance technology was employed. To this end, nuclear extracts from the monocytic cell line THP-1 and from the B lymphoma cell line BJAB were used to analyze their binding to the various S-, X-, Y-, CCAAT-, and TATA boxes. It could be demonstrated that the differential expression of DRB4A and –B was regulated via the ubiquitous TATA box. By contrast, the INF- γ stimulation of HLA expression in THP-1 and BJAB was mediated via the unique X box. Analyzing the DR4, DR7 and DR9 positive patients of an RA cohort, the DRB4B promoter, which has a higher transcriptional activity than the DRB4A promoter, is associated with radiographic progression of RA. This data is thus indicative of an impact of elevated HLA-DR expression on the progression of the disease.

Differential expression

HLA

MHC

Human leukocyte antigen

Major histocompatibility complex

Rheumatoid arthritis

Für Hans

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....	7
1 Einleitung	9
1.1 Das Immunsystem.....	9
1.2 Genetische Ursache von Autoimmunerkrankungen.....	10
1.2.1 Rheumatoide Arthritis	12
1.3 Humane Leukozyten-Antigene (HLA).....	14
1.3.1 „Shared epitope-Hypothese“	19
1.3.2 Differentielle Expression von HLA-DRB-Genen	20
1.4 Aufgabenstellung	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 DNA-Proben von RA-Patienten und Kontrollen.....	23
2.1.2 Zelllinien und Bakterienstamm	23
2.1.3 Vektoren.....	24
2.1.4 Oligonukleotide.....	25
2.1.5 Enzyme, Antikörper und Zytokine	26
2.1.6 Chemikalien, Puffer und Medien	27
2.1.7 Sonstiges Material	28
2.2 Methoden	29
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
2.2.2 DNA-Gelelektrophorese.....	30
2.2.3 DNA-Extraktion	30
2.2.4 Spaltung von DNA mit Restriktions-Endonukleasen	30
2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten	31
2.2.6 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	31
2.2.7 Plasmidpräparation.....	31
2.2.8 DNA-Sequenzierung	32
2.2.9 Kultivierung und Stimulierung von Zellen.....	33
2.2.10 Transfektion eukariotischer Zellen.....	34
2.2.11 Aktivitätsbestimmung der Luziferase.....	34
2.2.12 Aktivitätsbestimmung der β -Galaktosidase.....	34
2.2.13 Zellkernextraktion	35
2.2.14 Proteinbestimmung.....	35
2.2.15 Bindungsstudien mit Hilfe von surface plasmon resonance (SPR)	35
2.2.16 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	37
3 Ergebnisse	39
3.1 Bevorzugte Assoziation des DRB4B-Promotors und der DRB4-Spleißvariante mit dem Haplotyp DR7	39
3.2 Unterschiedliche HLA-DR-Oberflächenexpression auf einer monozytären und einer B-Lymphom-Zelllinie	43
3.3 Unterschiedliche transkriptionelle Aktivitäten der Promotoren des DR53-Locus in den Zelllinien THP-1 und BJAB.....	45
3.4 Unterschiedliches Bindungsverhalten von Zellkernlysaten an die einzelnen Promotorabschnitte des DR53-Locus.....	47

3.4.1	Vergleichbares Bindungsverhalten der Zellkernextrakte an die unterschiedlichen CCAAT-Boxen des DR53-Locus.....	47
3.4.2	Ähnliches Bindungsverhalten der Zellkernlysate an die verschiedenen vom DR53-Locus kodierten S-Boxen	49
3.4.3	Unterschiedliche Bindungen der Zellkernextrakte an die Y-Boxen von DRB1 und DRB4	50
3.4.4	Vermittlung der differentiellen Expression von DRB4A und DRB4B durch die TATA-Box	52
3.4.5	INF- γ -Stimulation der HLA-DR-Expression wird in den Monozyten durch die X-Box vermittelt	55
3.5	Assoziation des DRB4B-Promotors mit einem schweren Krankheitsverlauf der RA	57
4	Diskussion.....	58
4.1	Unterschiedliche transkriptionelle Aktivitäten der Promotoren des DR53-Locus in der THP-1- und in der BJAB-Zelllinie.....	58
4.2	Unterschiedlicher Beitrag der einzelnen Boxen der Promotoren des DR53-Locus an der HLA-DR-Expression	59
4.2.1	Feinregulation der DRB4A- und DRB4B-Expression durch die TATA-Box	61
4.2.2	Differentielle Expression in den Monozyten wird durch die X-Box vermittelt	62
4.3	Einfluß der differentiellen Expression von HLA-DRB-Genen auf die Schwere des Krankheitsverlaufes der RA	63
5	Zusammenfassung	66
6	Literaturverzeichnis.....	67
7	Anhang.....	72
	Danksagung	72
	Lebenslauf.....	73
	Publikationsliste	74
	Eidesstattliche Erklärung.....	75

Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bichinolin-4-Carbonsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin, dt.: Rinderserum
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CD	Cluster of Differentiation, dt.: Oberflächenantigen
CIA	Collagen-induced arthritis
CIITA	Class II Transactivator
CLIP	Class II invariant chain peptide
CMV	Cytomegalovirus
CRE	cAMP responsive element
CREB	CRE binding protein
CRP	C-reaktives Protein
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
DMARD	Disease modifying antirheumatic drugs
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	3'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DRFZ	Deutsches Rheuma-Forschungszentrum
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTE	Dithioerythriol
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter, dt.: Durchflußzytometrie
FCS	Fetal calf serum, dt.: Fötales Kälberserum
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
HLA	Human Leukocyte Antigen
HVR	Hypervariable Region
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon

LPS	Lipopolysaccharid
MCS	Multiple Cloning Site
mFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major Histocompatibility Complex
NF	Nuclear factor
NP-40	Nonylphenoxy-Polyethoxy-Ethanol
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
RFX	Regulatory factor X
rpm	Revolutions per minute, dt.: Umdrehungen pro Minute
RU	Resonance units
SA	Streptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SPR	Surface plasmon resonance
SSO	Sequenz-spezifische Oligonukleotide
SV40	Simian Virus 40
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	Transcription factor
TGF	Transforming growth factor
Th	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat
TRE	TPA responsive element
TREB	TRE binding protein
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
w/v	Weight per volume

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem der Wirbeltiere dient dazu, den Organismus vor Krankheitserregern (Bakterien, Pilze, Viren sowie Parasiten) zu schützen und damit das Überleben des Individuums zu sichern. Das Immunsystem ist dabei in die angeborene und in die erworbene Immunabwehr zu unterteilen. Die erworbene Immunabwehr ist spezifisch und durch ihre Fähigkeit zum Gedächtnis und zur Toleranz charakterisiert. Einige Zellen erwerben nach dem ersten Antigenkontakt ein Gedächtnis, um bei erneutem Antigenkontakt schneller und effektiver antworten zu können. Gleichzeitig muß das Immunsystem tolerant gegenüber körpereigenen Antigenen sein, damit die Immunantwort sich nicht gegen den eigenen Organismus richtet [1].

Die spezifische Immunabwehr wird durch die B- und T-Lymphozyten (B- und T-Zellen) vermittelt. Diese Zellen besitzen spezifische Rezeptoren, die in der Lage sind, Antigene spezifisch zu erkennen. Die Antigen-Rezeptoren der B-Zellen heißen Antikörper oder Immunglobuline (Ig), die der T-Zellen T-Zellrezeptoren (TCR). Die B-Zellen bekämpfen die Antigene extrazellulär, indem sie Antikörper freisetzen, die spezifisch Oberflächenmoleküle der Erreger erkennen können (humorale Immunantwort). Die T-Zellen hingegen benötigen für die Erkennung des Antigens dessen Präsentation über die Haupt-Histokompatibilitäts-Antigene (MHC) der Klasse I oder II. Die MHC-Moleküle der Klasse I (MHC-I) werden auf allen Körperzellen exprimiert, die MHC-Moleküle der Klasse II (MHC-II) indessen nur auf spezialisierten Zellen des Immunsystems, den Antigen-präsentierenden Zellen (APC). Zu den APC gehören B-Lymphozyten, Makrophagen/Monozyten und dendritische Zellen (DC). Die zytotoxischen (CD8-positiven) T-Zellen erkennen an MHC-I-Molekülen gebundene 8 – 11 Aminosäure lange Peptide, welche in der Regel von intrazellulären Erregern stammen. Daraufhin bekämpfen die zytotoxischen T-Zellen die von den Erregern infizierten Zellen (zelluläre Immunantwort). Die T-Helferzellen (Th) hingegen sind CD4-positiv und werden durch MHC-II-Moleküle aktiviert, welche 12 – 25 Aminosäure lange Peptide präsentieren. Diese Peptide gehen auf Proteine zurück, die von der Zelle aufgenommen und fragmentiert wurden [2].

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Ausschüttung von Zytokinen (Botenstoffen) werden die Th-Zellen in die Th1- und Th2-Zellen unterteilt. Die Th1-Zellen, die als wichtigstes Zytokin Interferon- γ (INF- γ) ausschütten, aktivieren nach der Präsentation durch das MHC-II-Molekül vor allem die Makrophagen und vermitteln damit die zelluläre Immunantwort.

Dagegen unterstützen die Th2-Zellen, welche besonderes die Interleukine 4 und -5 (IL-4 bzw. IL-5) sekretieren, die humorale Immunabwehr, indem sie die B-Zellen aktivieren [3].

Sowohl die T- als auch die B-Zellen durchlaufen eine zentrale und eine periphere Toleranzentwicklung. Durch negative Selektion soll ausgeschlossen werden, daß die T- oder B-Zellen, die körpereigene Antigene erkennen, in die Peripherie gelangen. Die zentrale Toleranzentwicklung der T-Zellen findet im Thymus statt. Bei der zentralen Toleranzentwicklung der B-Zellen geht man davon aus, daß sie größtenteils noch im Knochenmark stattfindet. Gelangen dennoch autoreaktive B- oder T-Zellen in die Peripherie, so werden sie im gesunden Menschen im Rahmen der peripheren Toleranzentwicklung durch klonale Deletion eliminiert oder in Anergie versetzt. Ein Versagen der peripheren Toleranz kann zu Autoimmunerkrankungen führen, bei der sich die fehlgesteuerte Immunantwort gegen körpereigene Strukturen richtet [4].

1.2 Genetische Ursache von Autoimmunerkrankungen

Die Autoimmunerkrankungen können in organspezifische und systemische (nicht-organspezifische) Erkrankungen unterteilt werden. Beim Diabetes mellitus richtet sich beispielsweise die fehlgesteuerte Immunantwort gegen ein einzelnes Organ, beim systemischen Lupus erythematodes (SLE) oder bei der rheumatoiden Arthritis (RA) gegen den gesamten Organismus [5].

Gemeinsam ist allen Autoimmunerkrankungen eine Assoziation mit bestimmten MHC-Genen der Klasse I oder II. Beim Menschen werden die MHC-Gene auch humane Leukozyten-Antigene (HLA) genannt. Tabelle 1 zeigt für mehrere Autoimmunerkrankungen, mit welchen HLA-Haplotypen die jeweilige Erkrankung assoziiert ist. Diese Assoziationen sind unterschiedlich stark und können sowohl positiv als auch negativ sein. Beispielsweise bezeichnet man den HLA-B27-Haplotypen als positiv mit der ankylosierenden Spondylitis und der reaktiven Arthritis assoziiert, da die Häufigkeit dieses Haplotyps unter den Patienten höher ist als unter den Kontrollen. Dagegen ist der Haplotyp HLA-DRB1*02 negativ mit dem Diabetes mellitus assoziiert, weil hier innerhalb der Kontrollgruppe mehr Träger dieses Haplotyps zu finden sind als unter den Patienten. Im Falle der RA ist vor allem der HLA-Haplotyp DRB1*04 positiv mit der Erkrankung assoziiert, da 69% der Patienten diesen Haplotypen tragen, aber nur 34% der Kontrollen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Assoziationen zwischen Autoimmunerkrankungen und HLA-Haplotypen

Erkrankung	HLA-Haplotyp	Häufigkeit in %	
		Patienten	Kontrollen
Ankylosierende Spondylitis	B27	90	9
Reaktive Arthritis	B27	79	9
Rheumatoide Arthritis (RA)	DRB1*04	69	34
Frühkindliche Polyarthritis	DRB1*11	55	25
	DRB1*08	38	7
	DPB1*0201	61	21
System. Lupus erythematodes (SLE)	DRB1*03	66	25
Diabetes mellitus	DRB1*03	52	25
	DQB1*0201	66	45
	DRB1*04	77	34
	DQB1*0302	60	14
	DRB1*02	7	28
	DQB1*0602	9	17
Zöliakie	DRB1*03	78	25
Myasthenia gravis	DRB1*03	45	25
Multiple Sklerose (MS)	DRB1*02	61	28

nach Ollier und Symmons, 1992

Darüber hinaus wurden für die RA die DRB1*01- und DRB1*10-Haplotypen in einigen Studien als krankheitsassoziiert beschrieben, während die Haplotypen DRB1*07 und DRB1*02 eher als protektiv gelten, da sie negativ mit der Krankheit assoziiert sind [6, 7].

Abbildung 1 zeigt die unterschiedlich starken Assoziationen der zehn HLA-DRB1-Haplotypen mit der RA. Es wurden dabei 139 RA-Patienten und 73 Kontrollen betrachtet. Die RA-Patienten gehörten zu einer Inzeptionskohorte, welche die von dem American College of Rheumatology (ACR) festgelegten Kriterien für RA erfüllten (siehe 1.2.1). Zu Beginn der Studie betrug deren Krankheitsdauer weniger als zwei Jahre, und es bestand eine Erstmedikation mit Disease modifying antirheumatic drugs (DMARD). Weiterhin wurde die Konzentration des C-reaktiven Proteins (CRP) zu Beginn der RA gemessen, da eine erhöhte Konzentration im Serum ein hohes Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf darstellt [8]. Die von der RA befallenen Gelenke wurden zu Beginn und während der Studie radiologisch untersucht, um das Fortschreiten der RA anhand des Röntgenscores zu bewerten. Bei dieser frühen Kohorte gab es eine deutliche Assoziation mit dem HLA-DRB1*04-Haplotypen, nicht aber mit dem HLA-DRB1*01-Haplotypen. Für die anderen Haplotypen war keine signifikante Assoziation mit der RA zu verzeichnen, es gab lediglich leichte positive (z.B. HLA-DRB1*10) bzw. negative (z.B. HLA-DRB1*02 oder -*07) Tendenzen.

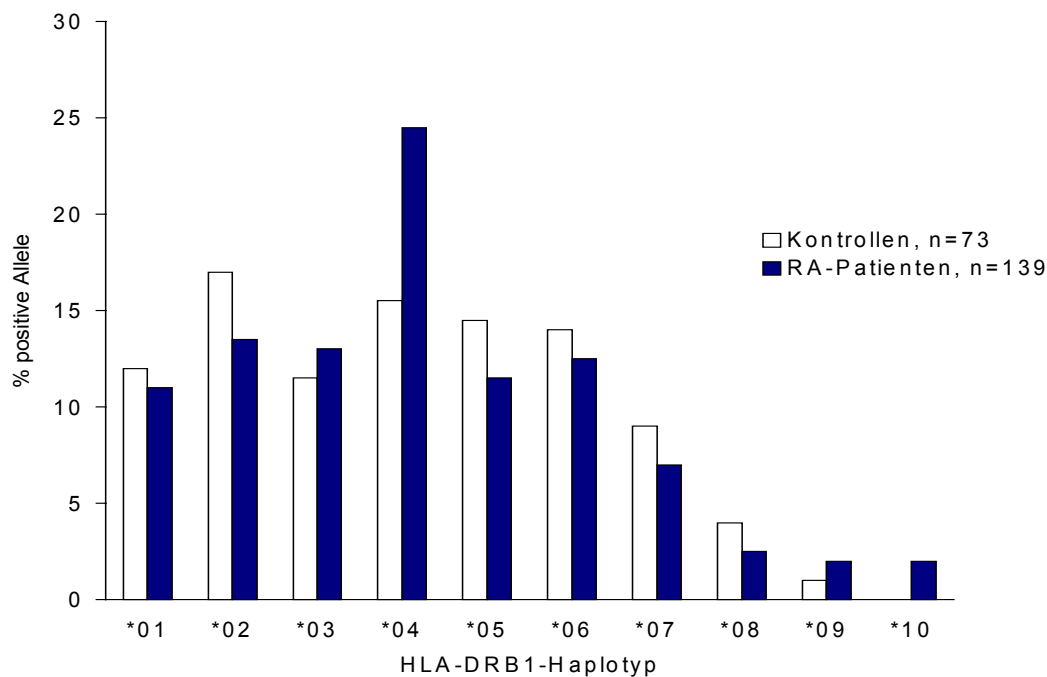


Abbildung 1: Assoziation von HLA-DRB1*04 mit der RA bei einer Kohorte früher Patienten. Die Balken zeigen anteilig, wieviele Kontrollen (weiß) und RA-Patienten (blau) welche der zehn verschiedenen HLA-DRB1-Haplotypen tragen.

1.2.1 Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA), die auch chronische Polyarthritits genannt wird, ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung, die prinzipiell alle Gelenke und selten auch innere Organe, Haut und Augen treffen kann. Meist befällt die RA jedoch die kleinen Gelenke, hauptsächlich die der Hände und Füße. Mit einer Häufigkeit von etwa 1% unter der Bevölkerung ist sie die häufigste rheumatische Erkrankung bzw. die zweithäufigste Autoimmunerkrankung. Die RA tritt vorwiegend zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr auf, Frauen erkranken etwa dreimal häufiger als Männer [9].

Die Krankheitsursache ist weitgehend ungeklärt. Neben Umweltfaktoren (Nahrung, Medikamente, Toxine aber auch Infektionen) werden aufgrund des häufigeren Auftretens bei Frauen auch endokrine (hormonelle) Faktoren diskutiert. Genetische Anlagen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle, da man anhand von Zwillingsstudien festgestellt hat, daß der monozygote Zwilling in 32% der Fälle auch unter der Erkrankung leidet. Die genetische Ursache für die Erkrankung an der RA wird vor allem – wie eben beschrieben - in den HLA-Genen gesehen.

Das Hauptsymptom der RA ist eine chronische Gelenkentzündung, wobei das Knorpel- und Knochengewebe als Folge des Einwachsens der Synovialmembran (Gelenkhaut) in den Gelenkspalt zerstört wird. Im betroffenen Gelenk lassen sich Infiltrationen von T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen nachweisen [10]. Es ist bisher

noch nicht geklärt, ob die T-Zellen nur den Entzündungsprozeß initiieren oder diesen auch später mit anderen Zellen aufrechterhalten. Die typischen Folgen dieser Entzündung im Gelenk sind Überwärmung, Schmerz und Schwellung und schließlich eine Funktionseinschränkung. Gesteuert wird diese Entzündung durch Zytokine, wobei als wichtigste Zytokine bei der Entstehung der RA der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und das Interleukin-1 (IL-1) gelten. Durch die Wirkung der Zytokine entsteht aus der Synovialmembran ein geschwulstartiges Gewebe, der sogenannte Pannus, welcher nach einer gewissen Zeit Knorpel, Knochen und Halteapparat des betroffenen Gelenks zerstört. TNF- α scheint für den zerstörerischen Entzündungsprozeß verantwortlich zu sein, während IL-1 die Zerstörung von Knorpelgewebe fördert und die knochenabbauenden Zellen (Osteoklasten) aktiviert [11].

Die typischen Symptome, die bei der RA auftreten, sind durch die folgenden Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) zusammengestellt worden:

- Morgensteifigkeit der Gelenke über mehr als sechs Wochen von mindestens 1h Dauer
- Arthritis von mehr als drei Gelenkregionen über mehr als sechs Wochen
- Arthritis an Hand- oder Fingergelenken über mehr als sechs Wochen
- Symmetrische Arthritis über mehr als sechs Wochen
- Subkutane Rheumaknoten
- Rheumafaktornachweis im Blut
- Für RA typische radiologische Veränderungen an den Händen

Von diesen sieben Kriterien müssen mindestens vier für die Diagnose einer RA erfüllt sein.

Die RA verläuft meistens allmählich fortschreitend, wobei die Gelenkzerstörungen fast immer nach einigen Jahren im Röntgenbild zu sehen sind. Mit der medikamentösen Behandlung kann man zwar bei der Mehrzahl der Patienten den Verlauf bremsen und häufig die Entzündung und die Schmerzen über lange Zeit gut kontrollieren, trotzdem besteht ein hohes Risiko für eine dauerhafte Invalidität.

Ein für die RA charakteristisches wenngleich nicht spezifisches Phänomen ist der Nachweis von Rheumafaktoren (RF). RF sind Immunglobuline (Ig), die an den konstanten Teil von IgG-Molekülen binden. Bei 70 – 90% aller RA-Patienten sind die RF im Blut nachweisbar, allerdings können diese auch bei einigen anderen Erkrankungen und sogar bei Gesunden vorhanden sein. Als weitere Parameter, die ebenfalls bei anderen Erkrankungen auftreten können, dienen die erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit sowie die vermehrte Bildung des CRP im Serum. Es zeigt sich, daß RF-positive Patienten einen ungünstigeren Krankheitsverlauf zeigen als RF-negative Patienten [12].

1.3 Humane Leukozyten-Antigene (HLA)

Damit möglichst viele verschiedene Antigene vom Immunsystem erkannt werden können, hat der Mensch im Laufe der Evolution eine Vielfalt von HLA-Molekülen entwickelt. Die HLA-Gene werden als polygen bezeichnet, da es mehrere Gene gibt, die für die entsprechenden Moleküle kodieren. Strukturell stellen sich die HLA-Moleküle als hochgradig polymorphe, an der Zelloberfläche exprimierte Heterodimere dar. Der HLA-Komplex ist größtenteils auf dem kurzen Arm des menschlichen Chromosoms 6 lokalisiert und umschließt einen Genabschnitt von etwa 3500kbp. Innerhalb dieses Komplexes sind die HLA-Gene in drei Klassen organisiert: HLA-Klasse-I, -II und -III. Die HLA-Klasse-I-Gene kodieren für die Oberflächenmoleküle HLA-A, -B und -C, die HLA-Klasse-III-Gene hingegen für einige Proteine des Komplementsystems. Die HLA-Klasse-II-Genregion beherbergt die an der Zelloberfläche exprimierten HLA-DR, -DQ- und -DP-Gene. Während in der HLA-DQ- und -DP-Region je ein α - und β -Kettengen exprimiert wird, finden sich im Bereich der HLA-DR-Region ein wenig polymorphes α -Kettengen (DRA) und mehrere exprimierte β -Kettengene (DRB1, DRB3, DRB4 und DRB5) sowie die nicht exprimierten Pseudogene DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 und DRB9. Ein besonderes Charakteristikum der HLA-DR-Region ist, daß die Zahl der DRB-Gene auf einem Chromosom vom jeweiligen Haplotyp abhängig ist [9]. Für das HLA-DR-Molekül gibt es fünf verschiedene allelische Linien, die in Abbildung 2 dargestellt sind.

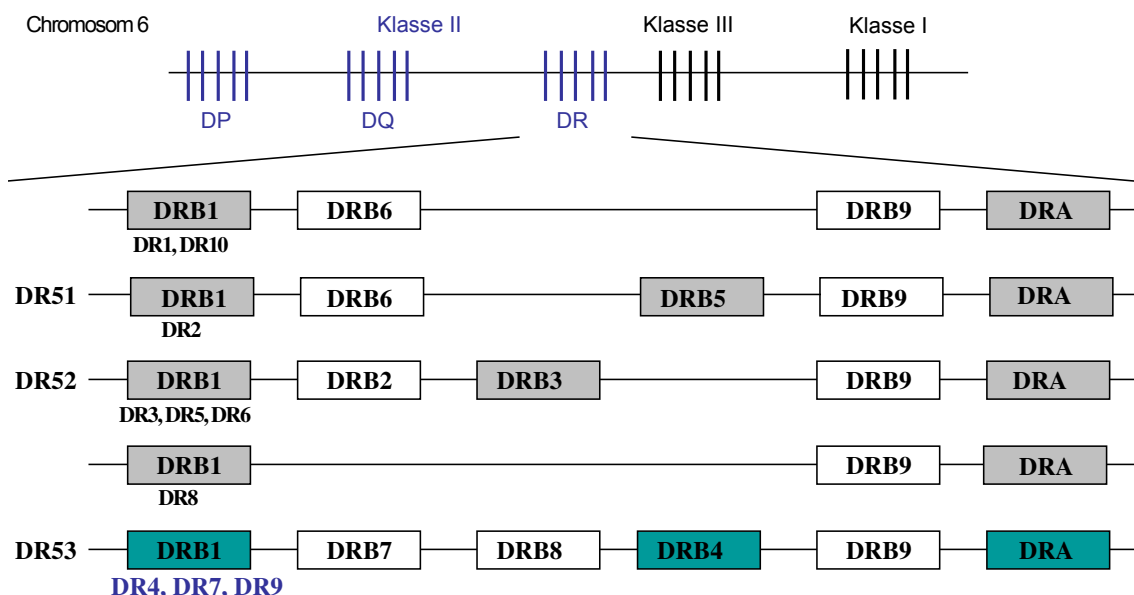


Abbildung 2: Der HLA-Locus besteht aus den Klassen I, II und III. Die HLA-Klasse-II besteht aus den Regionen DP, DQ und DR. Unten sind für HLA-DR die fünf allelischen Linien gezeigt. Farblich hinterlegte Rechtecke repräsentieren funktionelle Gene, wobei die grün hinterlegten Gegenstand der dieser Arbeit sind, weiße Rechtecke stellen Pseudogene dar.

Diese verschiedenen allelischen Linien tragen alle das gleiche DRA-Gen aber ein oder zwei verschiedene funktionelle DRB-Gene und führen deshalb zur Ausprägung von ein oder zwei unterschiedlichen HLA-DR-Molekülen pro Chromosom. Die DRB1-Gene werden in die zehn Hauptgruppen HLA-DRB1*01 (DR1) – HLA-DRB1*10 (DR10) unterteilt. Die DR1-, DR8- und DR10-Loci enthalten jeweils nur ein funktionelles DRB-Gen und ein DRA-Gen. Die DR51-, DR52- und DR53-Loci beinhalten jeweils zwei funktionelle DRB-Gene und ein DRA-Gen.

Die HLA-DR-Gene gehören zu den polymorphsten Genen überhaupt. Es sind bis heute 273 DRB1-Allele, 30 DRB3-Allele, 10 DRB4-Allele, 15 DRB5 und 2 DRA-Allele bekannt [13]. Alle HLA-DR-Moleküle besitzen die gleiche Sekundärstruktur, sie sind Glykoproteine, die aus einer 35kDa schweren α - und einer 28kDa schweren β -Kette zusammengesetzt sind. Beide Ketten weisen je zwei extrazelluläre Domänen (α 1 und α 2 bzw. β 1 und β 2), eine transmembrane Region und einen intrazellulären C-terminalen Abschnitt auf. Die Variation für diesen Bereich betrifft dabei ausschließlich die β -Kette, da sie die Antigenbindungsstelle (die peptidbindende Grube des HLA-DR-Moleküls) formt. Die einzig bekannte Variation der α -Kette liegt somit außerhalb der Antigenbindungsstelle. In der β -Kette gibt es drei Regionen mit einer erhöhten Variabilität, die hypervariablen Regionen (HVR) 1, 2 und 3, die ausschließlich vom Exon 2 kodiert werden. Die HVR, die in Abbildung 3 dargestellt sind, umfassen die Aminosäuresequenzen 9 – 13 (HVR1), 26 – 38 (HVR2) und 68 – 77 (HVR3).

Neben dem Polymorphismus der kodierenden Sequenzen, welcher der Erkennung möglichst vieler Erreger dient, gibt es einen Polymorphismus der regulierenden Sequenzen – der Promotoren. Die Promotoren sind die Regulationseinheiten der Gene und beinhalten mehrere spezifische DNA-Sequenzen (Boxen), die als Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren dienen. Die Promotoren der HLA-DRB-Gene sind durch die folgenden fünf Boxen charakterisiert: S-, X-, Y-, CCAAT- und TATA-Box [14, 15]. Die Y-Box ist eine invertierte CCAAT-Box, und die X-Box besteht aus den X1- und X2-Motiven. Die S-Box (auch W-, H- bzw. Z-Box genannt) wird als Duplikation der X-Box beschrieben [16]. Das X1-Motiv als Bestandteil der X-Box ist spezifisch für die Promotoren der HLA-II-Gene. Das X2-Motiv sowie die Y-, CCAAT- und TATA-Boxen hingegen sind auch für die Regulation anderer Gene bekannt.

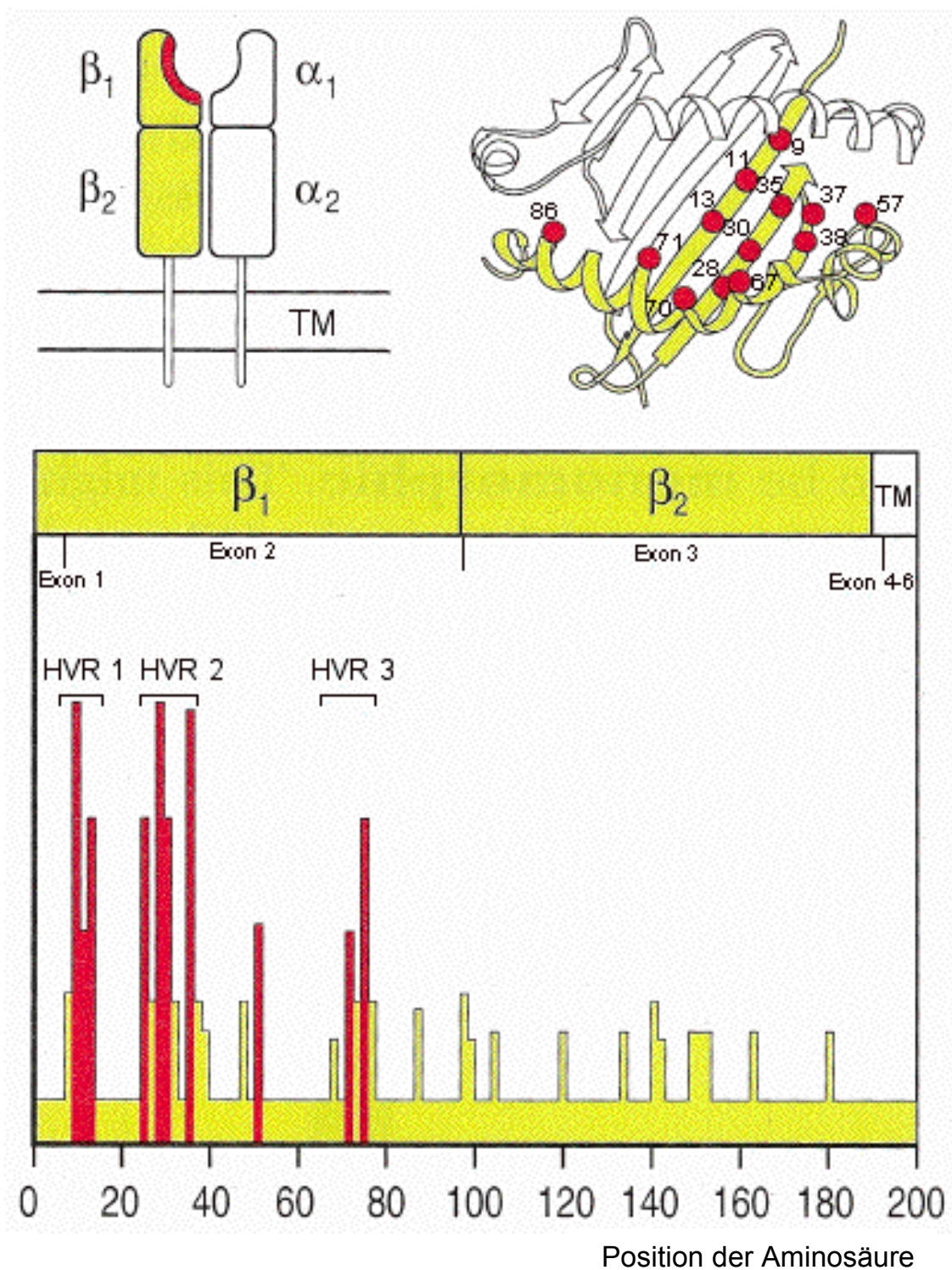


Abbildung 3: Variabilität innerhalb des HLA-II-Moleküls, modifiziert nach Janeway, Travers et al., Seite 142. In den oberen beiden Bildern wird die auf die β -Kette (gelb) beschränkte Variabilität verwiesen. Die hypervariablen Regionen, die in der β_1 -Domäne liegen, sind rot hervorgehoben. Im unteren Bild wird die Variabilität der einzelnen Positionen der Aminosäure für die β -Kette gezeigt, dabei sind die kodierenden Exons sowie die HVR angezeigt. TM = Transmembran-Domäne.

Die HLA-II-Promotoraktivität hängt von der Bildung spezifischer Komplexe ab, die aus verschiedenen Transkriptionsfaktoren sowie Transaktivator-Proteinen bestehen. Der Regulatory factor X (RFX)-Komplex, bestehend aus RFX5, RFXAP und RFXANK, bindet an die X1-Box und ist absolut erforderlich für die Expression von HLA-II-Genen [14]. An die X2-Box, die auch als cAMP responsive element (CRE)- oder TPA responsive element (TRE)-Box bekannt ist, bindet das X2 binding protein (X2BP) oder analog das CRE binding protein (CREB) bzw. TRE binding protein (TREB). Die nuclear factors (NF)-YA, -YB und -YC binden gemeinsam sowohl an die Y- als auch an die CCAAT-Box. Aufgrund der Ähnlichkeit von der S- und X-Box wird davon ausgegangen, daß der RFX-Komplex auch an die S-Box bindet [17]. An die TATA-Box bindet der Transcription factor IID (TFIID), der zu einem Komplex mehrerer Transkriptionsfaktoren gehört, die mit der RNA-Polymerase II interagieren [18, 19]. Der Klasse II-Transaktivator (CIITA), welcher differentiell in den APC exprimiert wird, bindet dann an die Transkriptionsfaktoren der X-Box (siehe Abbildung 4) [14]. Es ist umstritten, ob der CIITA noch mit den anderen Transkriptionsfaktoren interagiert. Durch die Protein-Protein-Wechselwirkungen wird die Transkriptionsrate der RNA-Polymerase II beeinflusst und damit die Expression der HLA-DR-Moleküle.

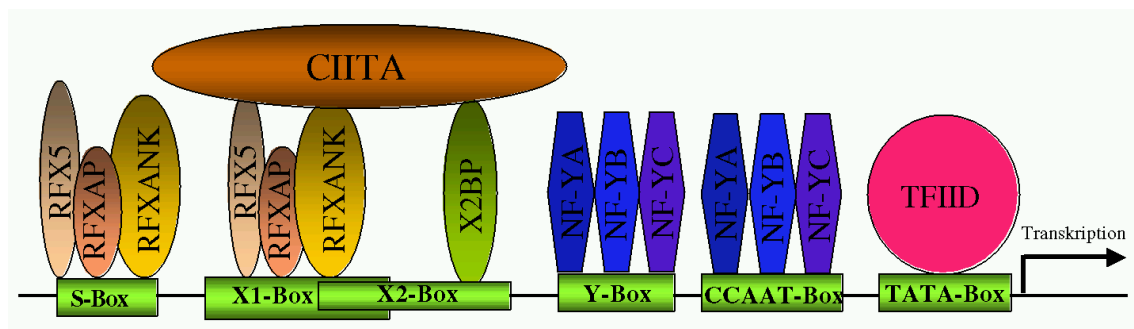


Abbildung 4: Koordinierte Bindung von Transkriptionsfaktoren und CIITA an den HLA-II-Promotor. Der RFX-Komplex bindet sowohl an die S- als auch an die X1-Box, X2BP bindet an die X2-Box. NF-Y bindet sowohl an die Y- als auch an die CCAAT-Box und TFIID an die TATA-Box. Der CIITA interagiert mit den Transkriptionsfaktoren der X-Box.

Im Gegensatz zur kodierenden Region ist der Polymorphismus der Promotoren nicht so stark ausgeprägt. Für jeden Haplotyp (DR1 - DR10) sowie für die beiden DRB3- und DRB5-Gene ist jeweils nur ein Promotor bekannt, lediglich für das DRB4-Gen sind zwei verschiedene Promotoren beschrieben [20]. Abbildung 5 zeigt die 257bp umfassenden Promotorsequenzen des DR53-Locus, die im Rahmen der Dissertation näher untersucht werden sollen. Die DRB4A- und -B-Promotoren unterscheiden sich an zwei Positionen im proximalen Promotorbereich sowie an drei Positionen nach dem Transkriptionsstart. Ferner gibt es eine DRB4-Spleißvariante, die eine Mutation von G nach A an der Spleißerkennungssequenz an der Grenze vom Intron 1 zum Exon 2 aufweist, welche die Expression eines funktionellen Proteins verhindert [21].

	S-Box	X1-Box	X2-Box
DR4	CTTTAAAGAAAGGAAATTGTTTCAGAAAAGGACCTTCATACAGCATCTCTGACCAGCGACTGATGATGCTATTGTACTCAGATG		
DR7	-----G-----G-----A-----		
DR9	-----G-----G-----A-----		
DRB 4A	-----AC-----GG-----A-----G--A-----G--		
DRB 4B	-----AC-----GG-----A-----G--A-----G--		

	Y-Box	CCAAT-Box	TATA-Box
DR4	CTGATTCGTTCTCCAACACTAGATTACCCAATCCACGAGCAAGGAAATCAGTAACTTCTTCCTATAATTTGGAATGTGGGTGGAGA		
DR7	-----A-----		
DR9	-----A-----		
DRB 4A	---C-G-----G-----A-G-----C-T-----G		
DRB 4B	---C-G-----G-----A-G-----C-T-----A-----G		

	Transkription	Exon 1
DR4	GGAGTCATAGTTCTCCCTGAGTGAGACTCACCTGCTCCTCTGGCCCTGGTCTGTCTCTGTCTCCAGCATGGTGTCTCTGAAGTTC	
DR7	-----C-----	
DR9	-----T-----	
DRB 4A	---C-----T-----TG-----G--G--A--A-----T-----C-----C--	
DRB 4B	---TG-----G-----A--A-----T-----C-----C--	

Abbildung 5: Vergleich der Promotorsequenzen der HLA-DRB-Allele des DR53-Locus. Für die fünf Sequenzen sind die S-, X-, Y-, CCAAT- und TATA-Boxen sowie Transkriptions- und Translationsstart hervorgehoben. Die Unterschiede zwischen den Sequenzen sowie einzelne Positionen der Basenpaare sind angezeigt.

Den zwei verschiedenen DRB4-Promotoren stehen zehn unterschiedliche DRB4-Allele gegenüber. In Tabelle 2 werden die einzelnen DRB4-Allele aufgeführt und mit dem DRB4*0101101-Allel verglichen. Die DRB4*0103101- und -*0103102N-Allele sind mit dem DRB4A-Promotor assoziiert, während das DRB4*0101101-Allel mit dem DRB4B-Promotor assoziiert ist [22, 23]. Für die anderen sieben Allele ist nicht bekannt, ob sie auch einen dieser beiden Promotoren tragen oder gänzlich andere. Von den zehn DRB4-Allelen werden lediglich sieben auch exprimiert. Die Variationen dieser Allele liegen für DRB4*0102 und -*0104 innerhalb der HVR3, für die anderen Allele außerhalb einer der drei HVR.

Tabelle 2: Variation in der kodierenden Region der DRB4-Allele

DRB4-Allel	Variation
DRB4*0101101	-
DRB4*0102	Mutation im Kondon 76
DRB4*0103101	Mutation im Kondon 135
DRB4*0103102N	trägt die DRB4-Spleißvariante
DRB4*01032	Mutation im Kondon 188
DRB4*01033	stille Mutation im Kondon 78
DRB4*0104	Mutation im Kondon 77
DRB4*0105	Mutation im Kondon 81
DRB4*0201N	11bp Deletion im Exon 2
DRB4*0301N	fehlendes Exon 2

N: Nullallel

Zudem gibt es eine geringere Variation innerhalb der Boxen der Promotoren als außerhalb, wenn man verschiedene Spezies miteinander vergleicht. Im Gegensatz dazu gibt es eine höhere Variation innerhalb der Boxen als außerhalb, vergleicht man verschiedene Allele einer Spezies miteinander [24]. Der Polymorphismus innerhalb der Boxen bedeutet für eine Spezies, wenn man unterstellt, daß dadurch unterschiedliche Promotoraktivitäten und somit unterschiedliche Expressionen an der Oberfläche resultieren, neben der Heterozygotie ein zusätzliches Maß an Flexibilität bei der Immunantwort. Kürzlich wurde ein Modell der Ko-Evolution der kodierenden und regulierenden Sequenzen beschrieben. Darin wird postuliert, daß sich der Polymorphismus der regulierenden Gensequenzen parallel zum Polymorphismus der kodierenden Gensequenzen entwickelt hat. Entsprechend sollten MHC-II-Sequenzen, die eine Th2-Differenzierung begünstigen, mit MHC-Molekülen, die in der Lage sind, Epitope eines parasitären Wurms zu präsentieren, assoziiert sein. Dagegen müßten Promotoren, welche die Th1-Antwort begünstigen, mit MHC-Molekülen assoziiert sein, die virale Epitope präsentieren [25].

1.3.1 „Shared epitope-Hypothese“

Die Mechanismen, mit denen die HLA-Allele Empfänglichkeit gegenüber bzw. Schutz vor Autoimmunerkrankungen vermitteln, sind noch weitgehend unbekannt. Es werden mehrere mögliche Mechanismen dafür diskutiert, z.B. die Deletion von Teilen des T-Zell-Repertoires durch ein endogenes Superantigen oder das Binden des Class II invariant chain peptide (CLIP) bzw. des CD4 an HLA-II-Moleküle [26].

Darüber hinaus gibt es als weiteres Modell die anschauliche „shared epitope-Hypothese“. Danach wird angenommen, daß bestimmte MHC-II-Moleküle in der Lage sind, krankheitsinduzierende Peptide zu binden sowie den T-Zellen zu präsentieren und damit Autoimmunerkrankungen zu ermöglichen [27]. Für die RA-assoziierten HLA-

Allele DRB1*0101, *0102, *0404, *0405 und *0408 wurde eine strukturelle Gemeinsamkeit gefunden, die auf die Aminosäuresequenz QRRAA in der dritten hypervariablen Region des HLA-II-Moleküls beruht. Diese Homologien liegen in der peptidbindenden Gruppe des HLA-II-Moleküls. Geringfügige Variation findet man bei DRB1*0401 (QKRAA) und DRB1*1001 (RRRAA) [28]. Andere Nebengruppen von HLA-DRB1*04, die nicht für eine der drei Aminosäuresequenzen kodieren, beispielsweise HLA-DRB1*0402 und *0403, sind auch nicht mit der RA assoziiert. Allerdings kodieren noch weitere Gene für ein „shared epitope“, z.B. HLA-DRB1*0409, -*10 und -*13, und sind nicht mit der Erkrankung assoziiert. Gleichwohl sind die Häufigkeiten dieser Nebengruppen unter der Bevölkerung geringer, um eine solche Assoziation zu belegen. Zudem gibt es ebenfalls Individuen, die kein solches „shared epitope“ tragen, aber trotzdem an der RA erkranken. Daher muß man zusätzliche Faktoren annehmen, welche die Entstehung der RA beeinflussen.

1.3.2 Differentielle Expression von HLA-DRB-Genen

In dieser Arbeit wird ein anderer Wirkungsmechanismus verfolgt, der möglicherweise für die Erkrankung ursächlich ist: die differentielle Expression der HLA-II-Allele. Dieser Wirkungsmechanismus beinhaltet sowohl eine unterschiedliche Expression der HLA-II-Allele auf den verschiedenen APC als auch eine unterschiedlich starke Expression von verschiedenen HLA-II-Allelen. Eine unterschiedliche Expression auf den APC bewirkt demnach quantitative Unterschiede bei der jeweiligen Interaktion zwischen APC (B-Lymphozyten, Makrophagen/Monozyten und dendritische Zellen) und T-Zellen. Die T-Zellen können entweder zu Th1- oder zu Th2-Effektorzellen polarisiert werden, je nach Zytokinproduktion der APC. Beispielsweise drängt das von den Makrophagen und DC ausgeschüttete IL-12 die T-Zellen zur Th1-Antwort, die B-Lymphozyten hingegen vermitteln bevorzugt Th2-Antworten. Eine starke HLA-II-Expression auf Makrophagen polarisiert dabei die Immunantwort in Richtung Th1, eine starke HLA-II-Expression auf B-Lymphozyten eher in Richtung Th2. Durch die Polarisierung der Immunreaktion in Richtung Th1 könnten dadurch Th1-vermittelte Erkrankungen beschleunigt sowie Th2-vermittelte Erkrankungen unterbunden werden. Beispielsweise gibt es bei der RA ein Ungleichgewicht zugunsten der Th1-Zellen [29].

Für die Maus wurde bereits beschrieben, daß ein Basenpaaraustausch in einem MHC-II-Promotor zu einer erhöhten Transkription in einer Makrophagen-Zelllinie führt, nicht aber in einer dendritischen Zelllinie [30]. Das Mausmodell für die RA, die Collagen-induced arthritis (CIA), zeigt ebenfalls wie die RA eine deutliche Assoziation mit MHC-II-Genen. Baumgart et al. haben beschrieben, daß zwei als protektiv im Zusammenhang mit der CIA geltende MHC-II-Allele im Vergleich zu einem krankheitsassoziierten MHC-II-Allel auf aktivierten Makrophagen bis zu 100fach stärker

exprimiert werden. Auf den B-Lymphozyten und DC hingegen war keine differentielle Expression der MHC-II-Gene zu verzeichnen [31]. Zusätzlich führte eine hohe MHC-II-Dichte auf den Makrophagen dazu, daß die T-Zellen in deren Gegenwart bevorzugt Zytokine ausschütteten, die eine Th1-Antwort begünstigen. Dagegen hatte eine geringe MHC-II-Dichte zur Folge, daß die T-Zellen vermehrt Th2-typische Zytokine produzierten.

Im Hinblick auf die differentielle Expression beim Menschen wurde die HLA-DR-Expression auf mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) untersucht. Dabei zeigte sich, daß sowohl die DR4- als auch die DRB4-Gene auf kultivierten menschlichen B-Lymphozyten innerhalb von zwei Tagen gleichmäßig exprimiert wurden. Bei den Monozyten hingegen konnte in dieser Zeit ein Anstieg der DRB4-Expression, nicht aber der DR4-Expression verzeichnet werden [32]. Darüber hinaus wurde dargelegt, daß es bei RA-Patienten zu einer Überexpression von HLA-DR-Molekülen sowohl im Synovium als auch auf den B-Lymphozyten des peripheren Bluts kommt [33, 34]. Insbesondere werden die mit der RA assoziierten HLA-DR4-Moleküle auf den B-Lymphozyten des peripheren Bluts von RA-Patienten stärker exprimiert als von Kontrollen [35].

1.4 Aufgabenstellung

Im Rahmen der Dissertation soll die differentielle Expression von krankheitsassoziierten und nicht-krankheitsassoziierten HLA-DRB-Allelen eingehender untersucht werden. Dabei sind die Gene des DR53-Locus Gegenstand der Analyse, da dieser Locus sowohl für den krankheitsassoziierten Haplotypen DR4 als auch für die neutralen Haplotypen DR7 und DR9 kodiert. Zunächst soll eine genaue Analyse der strukturellen Unterschiede der DR4-, DR7-, DR9-, DRB4A- und DRB4B-Promotoren klären, ob sie unterschiedlich unter den RA-Patienten und den Kontrollen verteilt sind. Im weiteren Verlauf werden die Transkriptionsaktivitäten der fünf Promotoren über die Aktivitätsbestimmung der Luziferase ermittelt. Dabei sollen die Promotoraktivitäten in zwei unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen bestimmt und miteinander verglichen werden, wofür die Monozytenzelllinie THP-1 sowie die B-Lymphom-Zelllinie BJAB gewählt werden.

Damit der Einfluß der einzelnen Promotorelemente auf die unterschiedlichen Promotoraktivitäten näher charakterisiert werden kann, soll mit Hilfe der surface plasmon resonance (SPR) das Bindungsverhalten der Transkriptionsfaktoren aus den Zellkernextrakten von THP-1 und BJAB an die unterschiedlichen S-, X-, Y-, CCAAT- und TATA-Boxen analysiert werden. Mittels SPR kann man die Interaktion von Zellkernextrakten der beiden Zelllinien mit den jeweiligen Promotorelementen auf einer Chipoberfläche durch optische Biosensoren untersuchen. Die Interaktion mehrerer Moleküle auf der Chipoberfläche bewirkt eine Massenänderung, was eine meßbare Änderung des Brechungsindex an der Oberfläche zur Folge hat.

Weiterhin soll darauf eingegangen werden, ob die strukturellen Unterschiede der Promotoren des DR53-Locus mit der Empfänglichkeit gegenüber der RA oder mit dessen Krankheitsverlauf korrelieren, wofür auf eine bereits zuvor beschriebene RA-Kohorte zurückgegriffen wird.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 DNA-Proben von RA-Patienten und Kontrollen

In dieser Arbeit wurde die DNA von 35 RA-Patienten und 28 gesunden Kontrollen untersucht. Die RA-Patienten gehörten zu einer frühen Inzeptionskohorte, welche die Kriterien des American College of Rheumatology erfüllten (siehe 1.2.1), und zu Beginn der Studie eine Krankheitsdauer von weniger als zwei Jahren hatten [8]. Aus dieser Kohorte wurden RA-Patienten ausgewählt, die entweder auf einem oder beiden Allelen DR4-, DR7- oder DR9 positiv waren. Unter ihnen waren acht Patienten DR4-homozygot, sechs DR4-DR7-heterozygot, fünfzehn DR7-heterozygot, zwei DR7-homozygot und vier DR9-heterozygot. Von den 35 RA-Patienten hatten fünfzehn eine CRP-Konzentration $\geq 15\text{mg/l}$ und siebzehn eine CRP-Konzentration $< 15\text{mg/l}$ im Serum zu Beginn der Studie, für die verbleibenden drei Patienten gab es keine Angaben.

Zu den 28 Kontrollen gehörten sechs DR4-homozygote, zwei DR4-DR7-heterozygote, sechzehn DR7-heterozygote, drei DR7-homozygote und ein DR9-heterozygoter Spender. Das Alter der Kontrollen lag zwischen 23 und 60 Jahren, das Durchschnittsalter betrug 37 Jahre. Die Kontrollen bestanden zur Hälfte aus Männern und Frauen.

Die Isolierung der genomischen DNA aus dem Blut erfolgte nach der Methode von Sykes [36]. Die HLA-DRB-Allele von RA-Patienten und Kontrollen wurden anhand einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) der genomischen DNA und biotinylierten, sequenzspezifischen Oligonukleotid (SSO)-Proben [37] typisiert.

2.1.2 Zelllinien und Bakterienstamm

- | | |
|-------|---|
| BJAB | Humane B-Lymphom-Zelllinie, Klon ACC 72 (DSMZ), isoliert aus dem Tumorgewebe eines Menschen mit Burkitt-Lymphom, HLA-DR8/DR5(6), nicht EBV-transformiert |
| THP-1 | Humane Monozyten-Zelllinie, Klon ACC 16 (DSMZ), isoliert aus dem peripheren Blut eines Menschen mit akuter myeloischer Leukämie, HLA-DR1/DR2, nicht EBV-transformiert |

Verwendeter *E. coli*-Stamm: DH5 α

2.1.3 Vektoren

pGL3-Basis Das von der Firma Promega verwendete Plasmid besteht aus 4818bp und enthält weder Promotor noch Enhancer. Dieser Reporter-Vektor (siehe Abbildung 6) besitzt eine multiple cloning site (MCS), in die ein Promotor insertiert werden kann. Das Luziferase-Gen (*luc+*), welches aus dem Glühwürmchen *photinus pyralis* isoliert wurde, dient als Reportergen, mit dem man die transkriptionelle Aktivität des Promotors bestimmen kann (siehe Kapitel 2.2.11). Zusätzlich trägt das Plasmid ein Ampicillin-Resistenz-Gen sowie ein synthetisches poly(A)-Signal und ein spätes SV40 poly(A)-Signal, um die Transkriptionseffizienz zu erhöhen.

pCMV β Dieser Vektor der Firma Clontech umfaßt 7164bp. Dieses Plasmid eignet sich zur Ko-Transfektion eukariotischer Zellen mit pGL3, da es den starken Promotor des humanen CMV trägt. Der pCMV β (siehe Abbildung 6) enthält das gesamte *E. coli* β -Galaktosidase-Gen mit eukariotischen Translations-Initiations-Signalen sowie ein Polyadenylierungssignal von SV40. Die Expression der β -Galaktosidase läßt sich mit der in Kapitel 2.2.12 beschriebenen Aktivitätsbestimmung der β -Galaktosidase ermitteln. Außerdem besitzt dieser Vektor ein Ampicillin-Resistenz-Gen.

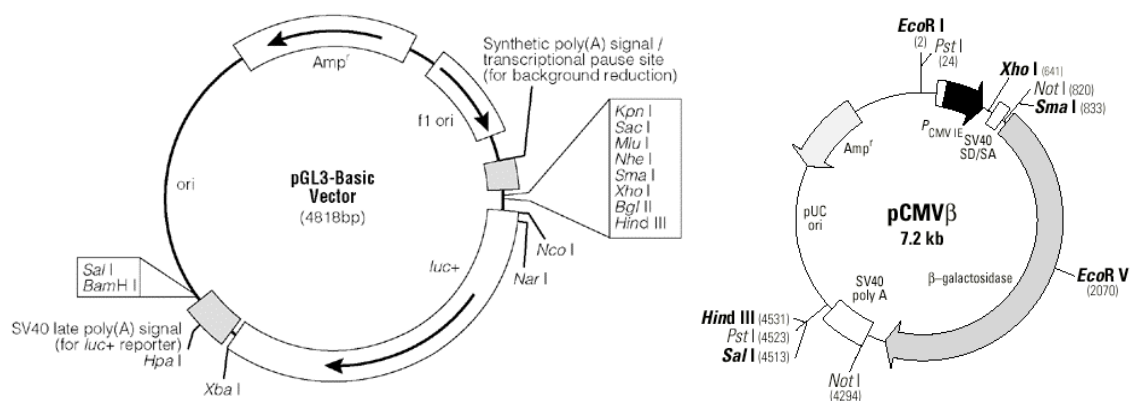


Abbildung 6: Expressionsvektoren pGL3-Basic und pCMV β

2.1.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma TIB Molbiol aus Berlin synthetisiert.

Für die Bestimmung der DRB4-Speißvarianten wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

5' DRB4 intron 1 5' -gAggCCgCCCgTgTgACCggA-3'
3' GH50 5' -CTCACCAACCCCgTAgTTgTgTCTgCA-3'

Nachstehende Oligonukleotide wurden für die Charakterisierung der HLA-DRB-Promotoren genutzt, dabei besaßen die 5'-Oligonukleotide eine Nhe I-Schnittstelle und das 3'-Oligonukleotid ein Bgl II-Schnittstelle:

5' W-DRB4 5' -gATCgCTagCCTTTAAgAagACAATTgTTTCaGAg-3'
5' W-DR4 5' -gATCgCTagCCTTTAAgAaggAAATTgTTTCaGAA-3'
5' W-DR79 5' -gATCgCTagCCTTTAAaggAggAAATTgTTTCaGAA-3'
3' ATG-DRB 5' -gAgCTTCagACACACgATgCTggAg-3'

Für die Sequenzierung der DRB4-Speißvarianten bzw. der DRB4-Promotoren wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

3' DRB4 exon 2 5' -CACCTCggCCCgCCTCCg-3'
5' S-DRB 5' -gATCgCTagCTTTCaGAAgAggACCTT-3'

Für die Versuche zum Bindungsverhalten wurden doppelsträngige, biotinylierte Oligonukleotide genutzt. Im folgenden sind jeweils nur die biotinylierten Einzelstränge aufgeführt, der korrespondierende Gegenstrang war ohne Biotin:

S-DR4 5' Bio-gTTTCaGAAAaggACCTTCATACaGc-3'
S-DR79 5' Bio-gTTTCaGAAgAggACCTTCATACaGc-3'
S-DRB4 5' Bio-gTTTCaGAggAggACCTTCATACaGc-3'
X-DR4 5' Bio-AgCATCTCTgACCagCgACTgAtgAtgCTATTgTACT-3'
X-DR79 5' Bio-AgCATCTCTgACCagCgACTgAtgAtgCTATTgTAAT-3'
X-DRB4 5' Bio-AgCATCTCTgACCagCAACTgAtgAtgCTAgTgAACT-3'
X-DRA 5' Bio-gAACCCTTCCCCTagCAACagAtgCgTCATCTCAAAA-3'
Y-DR479 5' Bio-TCaGATgCTgATTcGTTCTCCAACAC-3'
Y-DRB4A 5' Bio-TCaGgTgCTgACTggTTCTCCAACAC-3'
Y-DRB4B 5' Bio-TCaGATgCTgACTggTTCTCCAACAC-3'
CCAAT-DR4 5' Bio-CACTagATTACCCAATCCAcgAgCAA-3'

CCAAT-DR79	5' Bio-CACTagATTACCCAATCCACAAgCAA-3'
CCAAT-DRB4	5' Bio-CACgAgATTACCCAATCAAggAgCAA-3'
TATA-DR47	5' Bio-ACTTCTTCCCTATAATTTggAAtgTgg-3'
TATA-DR9	5' Bio-ACTTCTTCCCTATAATTTgAAAtgTgg-3'
TATA-DRB4A	5' Bio-ACTTCCTTCCTATAATTTggAAtgTgg-3'
TATA-DRB4B	5' Bio-ACTTCCTTCCTATAATTTgAAAtgTgg-3'
Random	5' Bio-ATCggCTATCTACggATCAGTACACT-3'
Random2	5' Bio-ATAgCCATCggCTATCTACggATCAGTACACTTAgCT-3'

2.1.5 Enzyme, Antikörper und Zytokine

<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Promega
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Promega
Restriktionsendonukleasen:	Eurogentec
• Bgl II	
• Nhe I	
Alkalische Phosphatase	Boehringer
T4-DNA-Ligase	Boehringer
Humaner Fc-Rezeptor-Block	Miltenyi Biotech
Monoklonale Antikörper:	DRFZ
• anti-HLA-DR (L243), Klon HB 55 (ATCC), PE-konjugiert, Konzentration: 300µg/ml	
• anti-CD3 (OKT3), Klon CRL-8001 (ATCC), PE-konjugiert, Konzentration: 300µg/ml	
Rekombinante humane Zytokine:	ImmunoKontakt
• GM-CSF	
• IL-1β	
• IL-4	
• INF-γ	
• TGF-β1	
• TNF-α	

2.1.6 Chemikalien, Puffer und Medien

Die Chemikalien wurden – soweit nicht anders angegeben – in analysenreiner Qualität von den Firmen Merck, Sigma und Roth bezogen.

10x AP-Puffer:	0,5M Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8,5
10x Label-Puffer:	700mM Tris-HCl, 100mM MgCl ₂ , 50mM DTT, pH7,6
10x Ligationspuffer:	600mM Tris-HCl, 50mM MgCl ₂ , 10mM DTE, 10mM ATP, pH7,5
10x PCR-Puffer:	670mM Tris-HCl, 160mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1% (w/v) Tween 20, pH8,8
10x Restriktionspuffer:	100mM Tris-HCl, 100mM MgCl ₂ , 500mM NaCl, 10mM DTE, pH7,5
2x Bindepuffer:	40mM Hepes, 10mM MgCl ₂ , 100mM KCl, 30% (w/v) Glycerol, 0,02% (w/v) TritonX-100, pH7,9
Biacore-Laufpuffer:	20mM Hepes, 1,5mM MgCl ₂ , 420mM NaCl, 0,2mM EDTA, 0,005% Biacore Surfactant P20, pH7,9
DNA-Ladepuffer:	50% (w/v) Glycerin, 10mM Tris, 10mg/ml Orange G, pH7,5
Kernextraktionspuffer A:	10mM Hepes, 1,5mM MgCl ₂ , 10mM KCl, 0,5mM DTT, pH7,9
Kernextraktionspuffer C:	20mM Hepes, 1,5mM MgCl ₂ , 420mM NaCl, 0,2mM EDTA, 25% (w/v) Glycerol, pH7,9
L-Broth-Medium:	3 L-Broth-Kapseln auf 100ml H ₂ O, 100µg/ml Ampicillin
L-Broth-Nährböden:	3 L-Broth-Kapseln, 1,5g Agar auf 100ml H ₂ O, 100µg/ml Ampicillin
NE2-Puffer:	50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl ₂ , 1mM DTT, pH7,9
PBS/BSA/Azid-Puffer:	PBS-Puffer + 0,5% (w/v) BSA + 0,1% (w/v) NaN ₃
PBS-Puffer:	130mM NaCl, 10mM Natrium-Phosphat-Puffer (100mM Na ₂ HPO ₄ , 20mM NaH ₂ PO ₄), pH7,4
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche
SOC-Medium:	2% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 20mM Glukose
TAE-Puffer:	40mM Tris, 20mM Essigsäure, 1mM EDTA, pH8

TBE-Puffer:	89mM Tris-Borat, 2mM EDTA
TE-Puffer:	10mM Tris, 1mM EDTA, pH8
TES-Puffer:	10mM Tris, 1mM EDTA, 300mM NaCl, pH8
Zellkulturmedium:	500ml RPMI 1640, 10% FCS (30min 56°C hitzeinaktivieren), 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 50µM 2-Mercaptoethanol

2.1.7 Sonstiges Material

γ - ³² P-ATP	Amersham
β -Galaktosidase-Kit	Promega
BCA-Kit	Interchim
Biacore 2000 System	Biacore
DNA-Molekulargewichtsmarker VI, VII	Boehringer
Elektroporationsküvetten (2mm/4mm)	Rapidozym
ELISA-Reader	MWG Biotech
FACS Calibur	Becton Dickinson
Filmentwicklungsmaschine X-omat 1000	Kodak
Gelextraktionskit	Genomed
Labeling-Kit	Promega
Luminometer Auto Lumat LB 953	Berthold
Luziferase-Kit	Promega
Phosphoimager FLA 2000G	Fuji
Photometer UV-1202	Shimadzu
Plasmidpräparations-Kits (Mini, Maxi)	Qiagen
Probequant G-50 Micro Säulen	Amersham
Röntgenfilm Biomax MS	Kodak
SA-Sensorchip	Biacore
Sequencing reaction kit (Big Dye)	Perkin Elmer
Sequenziergerät ABI PRISM 310	Perkin Elmer
Surfactant P20	Biacore
Thermocycler Mastercycler personal	Eppendorf
Transfektionsgerät Gene Pulser	BioRad
Transformationsgerät EasyJekt	Equibio

2.2 Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um die enzymatische Vervielfältigung eines DNA-Fragments zwischen zwei flankierenden Oligonukleotid-Primern (siehe 2.1.4). Der Ablauf der PCR gliedert sich in drei Stufen:

1. Thermische Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Matrize
2. Anlagerung der Primer an die Zielsequenz (Annealing)
3. Verlängerung der Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase (Extension)

Für die Sequenzierung und die Gewinnung von Inserts für Klonierungen wurde neben der *Taq*-DNA-Polymerase zusätzlich die *Pfu*-DNA-Polymerase eingesetzt, die proof-reading-Funktion besitzt. Die Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenz erfolgte im folgenden 50µl-Ansatz:

- 5µl 10x PCR-Puffer
- 2,5µl MgCl₂ (25mM)
- 0,5µl dNTPs (25mM)
- 1µl 5'-Primer (50µM)
- 1µl 3'-Primer (50µM)
- 2µl genomische DNA (ca. 200µg/ml)
- 2,5U *Taq*-DNA-Polymerase
- 0,3U *Pfu*-DNA-Polymerase
- ad 50µl H₂O

Dieser Ansatz wurde mit dem in Tabelle 3 aufgeführten Programm im Thermocycler vervielfältigt.

Tabelle 3: Programm für die PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Erst-Denaturierung	96°C	10min	1
Denaturierung	96°C	1min	35
Annealing	60°C	1min	
Extension	72°C	1min 30s	
End-Extension	72°C	10min	1

2.2.2 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach Größe erfolgte durch eine DNA-Gelelektrophorese. Dazu wurde ein 1,4%iges Agarosegel, welches 5µl 1%ige Ethidiumbromid-Lösung enthält, in eine horizontale Apparatur gegossen. Die Proben wurden mit 3µl DNA-Ladepuffer versetzt und auf dem Agarosegel für ca. 1h bei 130V in TAE-Puffer aufgetrennt. Mit Hilfe von UV-Durchlicht konnten die DNA-Banden sichtbar gemacht und fotografiert werden. Anhand des DNA-Molekulargewichtsmarkers konnte die Größe der DNA-Fragmente bestimmt werden.

2.2.3 DNA-Extraktion

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus der vorangegangenen Gelelektrophorese wurde das Gelextraktionskit der Firma Genomed verwendet. Hierzu wurde die gewünschte Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und für 15min bei 50°C in 300µl Puffer A1 (Hochsalzpuffer) zuzüglich 10µl Jetsorb-Suspension gelöst. Anschließend wurde die Lösung kurz zentrifugiert und das Pellet einmal mit Puffer A1 und zweimal mit Puffer A2 (Niedrigsalzpuffer) gewaschen. Zum Schluß wurde das Pellet 5min bei 50°C getrocknet und in 20µl TE-Puffer aufgenommen.

2.2.4 Spaltung von DNA mit Restriktions-Endonukleasen

Die PCR-Produkte sowie die Vektoren wurden mit Restriktions-Endonukleasen Nhe I und Bgl II in 30µl-Ansätzen folgender Zusammensetzung gespalten:

- 10U Nhe I
- 10U Bgl II
- 3µl 10x Restriktionspuffer
- 3-10µl DNA (je nach Stärke der Banden)
- ad 30µl H₂O

Die einstündige Restriktion erfolgte bei 37°C im Heizblock. Falls die Vektor-DNA für eine Klonierung benötigt wurde, wurde diese zusätzlich mit der alkalischen Phosphatase (AP) behandelt. Mit diesem Enzym wurde das 5'-Ende des Vektors dephosphoryliert, so daß eine Rezirkulierung einmalgeschnittener Vektoren bei der Ligationsreaktion vermieden wurde. Dazu wurde dem 30µl-Ansatz der Restriktion 5U AP und 4µl 10x AP-Puffer zugesetzt und für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der AP für 10min bei 65°C.

2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Vor der Ligation wurden die Restriktionsprodukte durch eine Mikrodialyse mit einer Nitrozellulosemembran von störenden Salzen befreit. Im folgenden 10µl-Ansatz wurden dann über Nacht bei 16°C die jeweiligen Inserts mit dem Vektor pGL3 an den Nhe I- und Bgl II-Schnittstellen ligiert:

- 7µl Insert
- 1µl pGL3-Vektor
- 1U T4-DNA-Ligase
- 1µl 10x Ligationspuffer

2.2.6 Transformation von *E. coli*-Zellen

Für die Transformation durch Elektroporation wurden 40µl elektrokompetente *E. coli*-Zellen und 10µl vorweg dialysierter Ligationsansatz in eine eisgekühlte 2mm-Elektroporationsküvette gegeben. Nach dem Elektoschock mit dem Transformationsgerät wurden die Zellen mit 600µl SOC-Medium versetzt. Danach wurde der Transformationsansatz auf antibiotikahaltige L-Broth-Nährböden gegeben und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Bakterien, die ein oder mehrere Plasmide aufgenommen haben, bildeten aufgrund ihrer Antibiotikaresistenz Kolonien auf den Nährböden. Positive Klone wurden mit Hilfe der Plasmidpräparation dahingehend geprüft, ob die Plasmide das gewünschte DNA-Fragment insertiert hatten.

2.2.7 Plasmidpräparation

Die Isolierung verschiedener Mengen an hochgereinigter Plasmid-DNA erfolgte nach den Protokollen der Firma Qiagen für Plasmid Mini- bzw. Maxi-Präparation, die für DNA-Mengen bis zu 20µg (Mini) bzw. bis zu 500µg (Maxi) vorgesehen sind. Von einer Übernachtskultur plasmidhaltiger Zellen wurden maximal 3 (250) ml abzentrifugiert (5000rpm). Das Pellet wurde in jeweils 250µl (10ml) P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 250µl (10ml) P2-Puffer wurde die nun stark viskose Suspension 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 350µl (10ml) N3- (P3-) Puffer zugegeben und vorsichtig gemischt. Im folgenden unterscheiden sich die Protokolle für die Mini- und Maxi-Präparation, so daß sie hier getrennt beschrieben werden.

Bei der Mini-Präparation wurde die Suspension für 10min zentrifugiert (13000rpm) und der Überstand auf die QIAprep-Säule gegeben. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde die Säule mit 500µl PB-Puffer und danach mit 750µl PE-Puffer gewaschen. Zum Schluß wurde die DNA mit 50µl EB-Puffer eluiert.

Bei der Maxi-Präparation hingegen wurde die Suspension in die QIAfilter-Patrone gegeben und für 10min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit dem Stempel durch den Filter der Patrone gepreßt und auf die vorher mit QBT-Puffer equilibrierte

Säule gegeben. Nach dem Durchlaufen der Suspension wurde die Säule zweimal mit 30ml QC-Puffer gewaschen und mit 15ml QF-Puffer eluiert. Das Eluat wurde nun mit 10,5ml 2-Propanol präzipitiert und für 30min bei 4°C zentrifugiert (11000rpm). Zum Schluß wurde das DNA-Pellet mit 70%-Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in einem geeigneten Volumen an TE-Puffer aufgenommen.

Die DNA-Konzentration aus der Mini- bzw. Maxi-Präparation wurde durch Messung der Absorption (A) bei 260nm im Photometer bestimmt ($1A_{260}=50\mu\text{g DNA/ml}$).

2.2.8 DNA-Sequenzierung

Bei der Sequenzierungsreaktion wurden fluoreszenzmarkierte ddNTPs verwendet, die beim Einbau neben den dNTPs zum Kettenabbruch der Elongation führen. Als Matritze diente entweder die Plasmid-DNA oder aber das PCR-Produkt, welches vorher durch die DNA-Gelelektrophorese gereinigt und anschließend aus dem Agarosegel extrahiert wurde.

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem Sequencing reaktion kit (Big Dye) der Firma Perkin Elmer, der *Taq*-DNA-Polymerase, F1, dNTPs, ddNTPs, MgCl_2 und Puffer enthält, in folgenden 10 μl -Ansätzen durchgeführt:

- 0,5 μl Plasmid-DNA oder 2 μl PCR-Produkt
- 2 μl Big Dye
- 1 μl Primer (5 μM) (siehe 2.1.4)
- ad 10 μl H_2O

Das Programm in Tabelle 4 wurde für die Sequenzierungsreaktion im Thermocycler verwendet.

Tabelle 4: Programm für die Sequenzierungsreaktion

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	96°C	10s	35
Annealing	45°C	5s	
Elongation	60°C	4min	

Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von

- 90 μl H_2O
- 10 μl 3M Na-Acetat, pH5
- 250 μl 100%-Ethanol

gefällt. Danach wurden die Ansätze für 15min zentrifugiert (13000rpm) und die DNA-Pellets nach dem Waschen mit 250 μl 70%-Ethanol erneut zentrifugiert. Die für 10min bei 50°C getrocknete DNA wurde in 25 μl H_2O aufgenommen und schließlich im Sequenziergerät ABI PRISM 310 sequenziert und ausgewertet.

2.2.9 Kultivierung und Stimulierung von Zellen

Die Kultivierung der beiden verwendeten Zelllinien BJAB und THP-1 erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Begasung. Zur Stimulierung der Zelllinien wurden unterschiedliche Stimuli verwendet, wobei die Konzentrationen der einzelnen Stimuli in Tabelle 5 aufgeführt sind. Die Dauer der Stimulation betrug jeweils 48h.

Tabelle 5: Konzentrationen der einzelnen Stimuli

Stimulus	Konzentration
anti-CD40	1-10µg/ml
anti-IgM	1-10µg/ml
cAMP	100µM
GM-CSF	10-1000U/ml
IL-1β	5ng/ml
IL-4	0,1-20U/ml
INF-γ	1000U/ml
LPS	5-50µg/ml
TGF-β1	20ng/ml
TNF-α	100-2000U/ml
TPA	1nM
Vitamin D ₃	250ng/ml

Mittels Durchflußzytometrie läßt sich feststellen, inwiefern die Stimulation Einfluß auf die Oberflächenexpression von HLA-DR-Molekülen hat. Der mit dem Fluoreszenzfarbstoff R-Phycoerythrin (PE) gekoppelte Antikörper L243 bindet dabei spezifisch an diese Moleküle und emittiert bei einer Wellenlänge von 575nm. Als Kontrolle für eine spezifische Bindung des L243-Antikörpers an die HLA-DR-Moleküle wurde ein Antikörper gleichen Isotyps gewählt, damit eine Bindung der Antikörper an die Fc-Rezeptoren der Zellen ausgeschlossen wird.

Das FACS-Gerät kann die Fluoreszenzintensität dieser Wellenlänge auf den Zellen *in vivo* detektieren. Dazu wurden ca. 10⁵ Zellen pro Ansatz mit PBS/BSA/Azid-Puffer gewaschen und 15min bei 4°C mit humanen IgG, welches die Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche blockieren soll, in einer Verdünnung von 1:10 inkubiert. Der L243-Antikörper wurde unter gleichen Bedingungen in einer 1:20 Verdünnung hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit PBS/BSA/Azid-Puffer gewaschen und in 500µl PBS/BSA/Azid-Puffer resuspendiert. Für die Isotypkontrolle (anti-CD3, PE-konjugiert) wurde analog verfahren. Mit Hilfe des Programms CellQuest wurden die Messungen am FACS-Gerät ausgewertet.

2.2.10 Transfektion eukariotischer Zellen

Die Zellen, die durch Elektroporation transient transfiziert werden sollten, wurden während der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Nachdem die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen wurden, wurden pro Transfektionsansatz 5×10^6 Zellen in serumfreies Zellkulturmedium gegeben. Zusätzlich wurden pro Ansatz 20µg Plasmid-DNA (pGL3-Vektor mit oder als Kontrolle ohne Promotor) sowie 5µg pCMVβ-Vektor (zur Ko-Transfektion) hinzugefügt. Der gesamte Transfektionsansatz wurde nun in eine 4mm-Elektroporationsküvette gefüllt und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die Plasmid-DNA an die Zellmembran anlagern kann. Die Elektroporation erfolgte bei 250V, 960µF und 0Ω , wobei die Zeitkonstante bei ca. 20ms^{-1} liegen sollte. Schließlich wurde die Probe gut gespült in 1,5ml vorgewärmtes Zellkulturmedium einer 12-well-Platte gegeben.

2.2.11 Aktivitätsbestimmung der Luziferase

Die Luziferase wandelt das Substrat Luziferin in Gegenwart von molekularem O_2 , ATP und Mg^{2+} in Oxyluziferin und CO_2 um. Bei dieser Reaktion wird Licht einer Wellenlänge von 562nm emittiert, das in einem Luminometer gemessen werden kann.

Zur Bestimmung der Luziferaseaktivität wurden die transfizierten THP-1-Zellen nach 6h und die BJAB-Zellen nach 22h zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend in 200µl Reporter-Lysis-Puffer aus dem Luziferase-Kit der Firma Promega lysiert. Nach einer 10minütigen Inkubation wurden die Lysate für 3min zentrifugiert (13000rpm) und der Überstand abgenommen. Zur Messung der Luziferaseaktivität wurde pro Ansatz 20µl Überstand in ein FACS-Röhrchen gegeben und im Luminometer unter Zusatz von je 100µl Substrat die Lichtemission detektiert. Dabei wurden die ermittelten Luziferasesaktivitäten der einzelnen Promotorkonstrukte in Relation zur Aktivität des pGL3-Vektors ohne Promotor gesetzt.

2.2.12 Aktivitätsbestimmung der β-Galaktosidase

Die β-Galaktosidase katalysiert die Hydrolyse des Substrats o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid (ONPG). Das Produkt o-Nitrophenol dieser Reaktion kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 405nm nachgewiesen werden.

Für die Bestimmung der β-Galaktosidaseaktivität wurden die Zelllysate vom Luziferase-Assay verwendet. Je 50µl Zelllysat wurde mit 50µl 2x Assaypuffer aus dem β-Galaktosidase-Kit der Firma Promega in einer Mikrotiterplatte (96-well) gemischt. Nach einer Inkubationszeit (1h, 37°C) konnte die Umsetzung des Substrats bei 405nm im ELISA-Reader gemessen werden. Schließlich wurden die Luziferase-Werte durch die β-Galaktosidase-Werte dividiert, um die relative Luziferaseaktivität zu erhalten.

2.2.13 Zellkernextraktion

Zur Ermittlung der Bindungsaffinität der jeweiligen Transkriptionsfaktoren an die unterschiedlichen Boxen der HLA-DR-Promotoren wurden die Zellkernlysate von den Zelllinien THP-1 und BJAB extrahiert.

Für die Zellkernextraktion wurden 5×10^7 Zellen pro Ansatz genommen und zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde nun in 500µl Kernextraktionspuffer A resuspendiert und 15min auf Eis inkubiert. Nach dem Hinzufügen von NP-40 in einer Endkonzentration von 0,5% wurde die Suspension 10s gevortext und 20s bei 6500rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde danach in 150µl Kernextraktionspuffer C aufgenommen und 30min mit dem Magnetrührer auf Eis gerührt. Zum Schluß wurde nach der 10minütigen Zentrifugation (13000rpm) der Überstand abgenommen und 10µl zur Proteinbestimmung des Zellkernextraktes abgenommen.

2.2.14 Proteinbestimmung

Mit dem BCA-Proteinassay lassen sich insbesondere Peptidbindungen detektieren. Cu^{2+} -Ionen werden dabei im alkalischen Milieu zu Cu^{1+} -Ionen reduziert. Diese komplexieren mit 2 Molekülen BCA (Bichinolin-4-Carbonsäure) und ergeben einen violetten Farbstoff mit einer Absorption bei 562nm.

Um den genauen Proteingehalt der Zellkernextrakte zu ermitteln, wurde mit Hilfe von BSA eine Eichreihe von 0 – 2mg BSA/ml erstellt. Die Lösungen A und B des BCA-Assays werden dabei im Verhältnis 50:1 gemischt. Je 2ml des Gemisches wurden nun entweder mit 100µl Standard oder Zellkernextrakt (1:10 verdünnt) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anhand der im Photometer gemessenen Absorption bei 562nm ließ sich über die Eichgerade der Proteingehalt der unbekannten Proben ermitteln.

2.2.15 Bindungsstudien mit Hilfe von surface plasmon resonance (SPR)

Das optische Phänomen der surface plasmon resonance (SPR) wurde zur Analyse der Interaktion von Zellkernextrakten mit Promotor-Oligonukleotiden verwendet. In Biacore-Instrumenten wird einer der Reaktionspartner, der Ligand, auf einen Sensorchip immobilisiert, während der andere Reaktionspartner, der Analyt, in kontinuierlichen Fluß über die Sensorchip-Oberfläche geleitet wird. Die Detektion der Bindung basiert darauf, daß eine Massenänderung auf der Chipoberfläche, hervorgerufen durch die Interaktion von Ligand und Analyt, eine Änderung des Brechungsindex an der Chipoberfläche bewirkt. Die Bindung wird in Form eines SPR-Signals, ausgedrückt in Resonance Units (RU), gemessen. Durch kontinuierliche Aufzeichnung des Signals kann die Bindungskinetik in Echtzeit verfolgt werden.

Zur Messung der Interaktion von Zellkernlysaten mit spezifischen Promotor-Oligonukleotiden wurde wie folgt verfahren: Zuerst wurde der Streptavidin (SA)-Sensorchip nach Angaben des Herstellers vorbehandelt, um lose Verbindungen der Chipoberfläche zu entfernen. Dies geschah durch drei kurze Pulse mit 15 μ l 1M NaCl/50mM NaOH und fünf kurze Pulse mit 5 μ l 0,05% SDS in TES-Puffer. Als nächstes wurden doppelsträngige Oligonukleotide, welche die einzelnen Boxen der unterschiedlichen Promotoren repräsentieren, hergestellt, indem jeweils die beiden komplementären Stränge des Promotorbereichs hybridisiert wurden. Dazu wurde der biotinylierte Strang mit dem unmarkierten Gegenstrang (siehe 2.1.4) im Verhältnis 1:2 gemischt und für 3min auf 95°C erhitzt und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Jedes biotinylierte doppelsträngige Oligonukleotid wurde in TES-Puffer bis zu einer Endkonzentration von 100nM verdünnt und mit einer Flußrate von 5 μ l/ml mit TES-Puffer als Laufpuffer in eine der vier Flußzellen des Sensorchips injiziert. Die Bindung des Oligonukleotids wurde vom Instrument aufgezeichnet, und die Injektion nach Immobilisierung von 400RU DNA manuell beendet. Die Chipoberfläche wurde mit TES-Puffer gespült und anschließend mit Biotin abgesättigt. Dazu wurde 1min lang eine Biotinlösung (2mg/ml in 10mM NaOH) mit einer Flußrate von 5 μ l/ml und TES-Puffer als Laufpuffer injiziert. Der Chip wurde anschließend nochmals mit TES-Puffer gespült.

Alle Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 25°C und einer Flußrate von 30 μ l/ml in Biacore-Laufpuffer mit einer Zellkernlysate-Konzentration von 100 μ g/ml. Es wurden jeweils 250 μ l Probe injiziert und nach Beendigung der Assoziationszeit zur Aufnahme der Dissoziationskinetik für 300s durch konstanten Pufferfluß ersetzt. Nach jedem Zyklus wurde der Chip durch zwei kurze Pulse von 0,05% SDS in TES-Puffer regeneriert. Die Interaktion der Zellkernlysate mit der DNA wurde für jeden Zyklus durch kontinuierliche Messung der RU festgehalten. Die Datenanalyse erfolgte mit der BIAevaluation-Software, Version 3.0. Das Bindungsverhalten wurde ermittelt durch den RU-Wert am Ende der Assoziationsphase abzüglich des RU-Wertes vor der Injektion der Zellkernproteine. Von den spezifischen Bindungsaffinitäten wurde dann der RU-Wert der Referenzzelle ohne DNA subtrahiert und auf die unspezifische DNA (Random) bezogen (im Falle der X-Box-Oligonukleotide aufgrund der längeren Sequenz auf Random2).

2.2.16 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Der Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) ist eine Alternative zur Bestimmung der Bindungsaffinität mittels Biacore-Technologie. Hierbei werden die einzelnen radioaktivmarkierten Promotorabschnitte mit den Zellkernlysaten gemischt und anschließend durch ein natives Polyacrylamidgel (PA-Gel) elektrophoretisch getrennt. Um die Bindungsstärke der Proteine des Zellkernextraktes an zwei verschiedenen Zielsequenzen zu vergleichen, werden die beiden radioaktivmarkierten Promotorabschnitte zusätzlich mit unmarkierter Promotor-DNA derselben Sequenz kompetiert.

Für den EMSA wurde zunächst der sense-Strang (siehe 2.1.4) der Zielsequenz radioaktiv markiert, indem er durch die T4-Kinase vom Labeling-Kit der Firma Promega am 3'-Ende mit γ - ^{32}P -ATP phosphoryliert wurde. Diese Reaktion erfolgte im folgenden Ansatz:

- 2 μl Oligonukleotid (10 μM)
- 2 μl 10x Label-Puffer
- 2 μl T4-Kinase
- 5 μl γ - ^{32}P -ATP
- 9 μl H_2O

Die Probe wurde 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion unter Zugabe von 2 μl 500mM EDTA gestoppt. Anschließend wurde die Probe mit H_2O auf 50 μl aufgefüllt und durch Auftragen auf eine Probequant G-50-Säule vom überschüssigen γ - ^{32}P -ATP befreit. Dazu wurde die Säule in ein 1,5ml-Gefäß gegeben und 2min bei 1000rpm zentrifugiert. Das gereinigte Eluat wurde nun mit dem komplementären Oligonukleotid (siehe 2.1.4) hybridisiert, dieser Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 50 μl ^{32}P -Oligonukleotid (0,2 μM)
- 5 μl komplementäres Oligonukleotid (100 μM)
- 5 μl 10x NE2-Puffer
- 40 μl H_2O

Nach dem zweiminütigen Erhitzen der Probe auf 95°C wurde sie langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die anschließende 15minütige Bindungsreaktion der doppelsträngigen Promotorabschnitte an die Zellkernextrakte erfolgte im folgenden 20 μl -Ansatz:

- 10 μl 2x Bindepuffer (inkl. Protease-Inhibitor-Cocktail)
- 1 μl doppelsträngiges Oligonukleotid (0,1 μM)
- 2 μl Kernextrakt (2mg/ml)
- 2 μl poly dI/dC (0,5mg/ml)

- Kompetitoren in unterschiedlichen Konzentrationen (0-10 μ M)
- ad 20 μ l H₂O

Danach wurden die Proben durch eine native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Dazu wurde vorerst ein unteres, etwa 2cm breites 10%iges PA-Gel in die Elektrophoresekammer gegossen, es beinhaltete:

- 2,7ml 30% Acrylamid
- 0,8ml 5x TBE-Puffer
- 14 μ l 20% APS
- 9 μ l TEMED
- 4,5ml H₂O

Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde ein weiteres, etwa 13cm breites PA-Gel in die Apparatur gegossen, das 5%ige PA-Gel setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 5,35ml 30% Acrylamid
- 4ml 5x TBE
- 70 μ l 20% APS
- 45 μ l TEMED
- 20,65ml H₂O

Nach Beendigung des einstündigen Vorlaufs in 0,5x TBE-Puffer bei 200V, 20mA und 4°C wurden die Proben mit 3 μ l DNA-Lade-Puffer versetzt und für ca. 3h unter gleichen Bedingungen elektrophoretisch getrennt. Schließlich wurde das Gel für ca. 1h bei 70°C getrocknet und über Nacht auf einem Röntgenfilm exponiert. Zur Quantifizierung der einzelnen Banden des PA-Gels wurden sie auf dem Phosphoimager mit dem Programm Image Quant ausgewertet. Dazu wurde die Intensität der einzelnen Banden auf die jeweilige Gesamtintensität der Spur bezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Bevorzugte Assoziation des DRB4B-Promotors und der DRB4-Spleißvariante mit dem Haplotyp DR7

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst der mit der RA assoziierte Haplotyp DR4 mit den DR7 und DR9-Haplotypen, die nicht mit der RA assoziiert sind, hinsichtlich struktureller Unterschiede miteinander verglichen. Für die Untersuchung wurden 35 RA-Patienten und 28 Kontrollen ausgewählt, die entweder auf einem oder auf beiden Chromosomen DR4-, DR7- oder DR9-positiv waren. Unter den 63 RA-Patienten und Kontrollen gab es insgesamt 36 DR4-, 49 DR7- und 5 DR9-Haplotypen. Für die Bestimmung der Assoziation der drei Haplotypen mit den beiden unterschiedlichen DRB4-Promotoren und mit der DRB4-Spleißvariante wurden 76 DRB4-Promotoren sowie 86 Intron 1/Exon 2-Grenzen amplifiziert und sequenziert (siehe 2.2.1-2.2.3 und 2.2.8). Die Auswertung der Sequenzen ist für die Patienten in Tabelle 6 und für die Kontrollen in Tabelle 7 dargestellt. Zusätzlich sind die von Listing et al. bestimmten CRP-Konzentrationen zu Beginn der Erkrankung mit der RA aufgeführt. Die Sequenzen wurden anschließend - wo es möglich war - mit den drei Haplotypen korreliert. Eine Zuordnung war in den Fällen, die DR4/DR7-heterozygot waren und nur eine DRB4-Spleißvariante und/oder zwei unterschiedliche DRB4-Promotoren besaßen, nicht möglich.

Tabelle 6: Daten von Patienten

Patienten-Nr.	HLA-DRB1-Allel-Kombination	CRP zu Beginn [mg/l]*	DRB4-Spleißvariante	DRB4-Promotor
02126	4/4	21,5	-/-	A/B
06019	4/4	3,0	-/-	A/A
06022	4/4	3,0	-/-	A/A
10016	4/4	14,5	-/-	A/A
10041	4/4	23,0	-/-	A/A
10052	4/4	24,4	-/-	A/B
10086	4/4	5,0	+/-	A/A
20044	4/4	20,0	-/-	A/B
02112	1/7	12,1	+	A
06092	1/7	n.b.	+	A
10044	1/7	8,0	+	A
20029	1/7	28,3	-	A
06007	2/7	76,0	-	B
10021	2/7	5,0	-	A
10050	2/7	0,5	-	B
10087	2/7	27,7	-	B
20069	2/7	n.b.	-	B
10015	3/7	5,0	-	A
10076	3/7	5,0	+	A
02104	4/7	19,7	-/-	n.b.
02109	4/7	83,4	-/-	n.b.
06011	4/7	2,8	-/-	n.b.
20021	4/7	10,0	+/-	n.b.
20072	4/7	5,0	-/-	n.b.
34004	4/7	n.b.	+/-	n.b.
10039	5/7	5,0	-	B
10079	5/7	7,3	-	A
02102	6/7	25,9	-	B
02003	7/7	34,8	+/-	A/A
10027	7/7	5,0	+/+	A/A
08022	7/8	16,0	-	B
02002	1/9	25,9	-	A
06005	2/9	24,0	-	A
10059	6/9	5,0	-	A
10126	6/9	10,0	-	A

einzelne Allele sind durch einen Schrägstrich getrennt, n.b.: nicht bestimmt, * siehe Listing et al., 2000

Tabelle 7: Daten von Kontrollen

Kontrollen-Nr.	HLA-DRB1-Allel-Kombination	DRB4-Spleißvariante	DRB4-Promotor
KG044	4/4	+/-	A/A
KG050	4/4	-/-	A/B
KG064	4/4	-/-	A/B
KG113	4/4	-/-	A/A
KG122	4/4	+/-	A/A
KG128	4/4	-/-	A/B
KG014	1/7	-	B
KG077	1/7	-	B
KG016	2/7	+	A
KG017	2/7	-	B
KG063	2/7	-	A
KG089	2/7	+	A
KG101	2/7	-	B
KG110	2/7	-	B
KG008	3/7	-	A
KG111	4/7	-/-	A/A
KG134	4/7	-/-	A/B
KG009	5/7	+	A
KG060	5/7	+	A
KG073	5/7	-	B
KG124	5/7	+	A
KG129	5/7	-	A
KG071	6/7	-	A
KG059	7/7	+/-	A/B
KG108	7/7	-/-	A/A
KG127	7/7	-/-	B/B
KG114	7/8	-	A
KG007	2/9	-	A

einzelne Allele sind durch einen Schrägstrich getrennt

Abbildung 7 zeigt, daß sowohl der DRB4B-Promotor als auch die DRB4-Spleißvariante bevorzugt mit dem Haplotypen DR7 assoziiert ist. Hinsichtlich der Assoziation mit dem DRB4B-Promotor besaßen 38% der DR7-positiven Allele einen solchen Promotor, aber nur 21% der DR4-positiven Allele. Kein DRB4B-Promotor war unter den DR9-positiven Allelen zu finden (siehe Abbildung 7A). Für die Assoziation der DRB4-Spleißvariante wurden ausschließlich die DRB4A-positiven Allele betrachtet, da nur sie eine Spleißvariante tragen können. Insgesamt trugen 50% der DR7-positiven Allele eine DRB4-Spleißvariante, wohingegen lediglich 13% der DR4-positiven Allele eine solche Spleißvariante trugen. Unter den fünf DR9-positiven Allelen wurde keine Spleißvariante gefunden (siehe Abbildung 7B). Darüber hinaus gab es keine Unterschiede zwischen den Häufigkeiten der Assoziation unter den RA-Patienten und unter den Kontrollen (Daten nicht gezeigt).

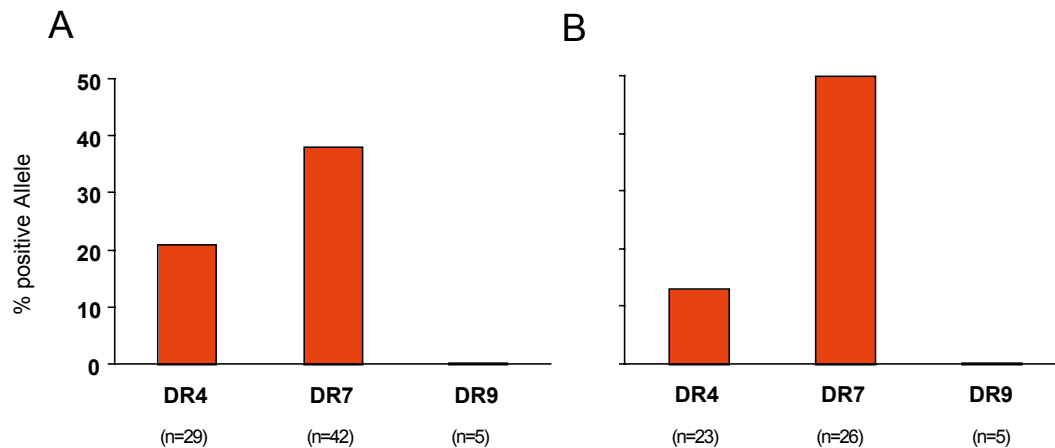


Abbildung 7: Differentielle Assoziation von HLA-DRB1*04, -*07 und -*09 mit dem DRB4B-Promotor (A) und der DRB4-Spleißvariante (B). Die Analyse erfolgte mittels Amplifikation und Sequenzierung der jeweiligen Gensequenz. Die Balken repräsentieren die einzelnen Häufigkeiten für die DR4-, DR7- und DR9-Haplotypen, die mit dem DRB4B-Promotor (A) oder der DRB4-Spleißvariante (B) assoziiert sind.

3.2 Unterschiedliche HLA-DR-Oberflächenexpression auf einer monozytären und einer B-Lymphom-Zelllinie

Die strukturellen Unterschiede der fünf verschiedenen Promotoren des DR53-Locus sollen nun auf molekularer Ebene in zwei unterschiedlichen APC weiter analysiert werden. Dazu wurden stellvertretend zwei verschiedene Zelllinien ausgewählt, zum einen die monozytäre Zelllinie THP-1 und zum anderen die B-Lymphom-Zelllinie BJAB. Endogen kodieren die beiden Zelllinien für unterschiedliche Haplotypen: THP-1 wurde positiv für DR1 und DR2 typisiert, während BJAB positiv für DR8 und DR5 (oder DR6) war. Die Allele DR5 und DR6 konnten dabei nicht eindeutig differenziert werden.

Zur weiteren Analyse wurde die Oberflächenexpression von HLA-DR-Molekülen der beiden Zelllinien durch FACS-Analyse mit dem monoklonalen Antikörper L243 bestimmt (siehe 2.2.9) und miteinander verglichen. Weiterhin wurden die zwei Zelltypen mit unterschiedlichen Substanzen stimuliert (siehe Tabelle 5), um deren Einfluß auf die HLA-DR-Expression zu ermitteln. Abbildung 8 zeigt, daß nur wenige der unstimulierten THP-1-Zellen positiv für HLA-DR sind. Durch die 48stündige Stimulation mit 1000U/ml $\text{INF-}\gamma$ wurde in allen THP-1-Zellen die HLA-DR-Expression induziert, was an der Verschiebung der Population in Richtung einer höheren Fluoreszenzintensität zu erkennen ist.

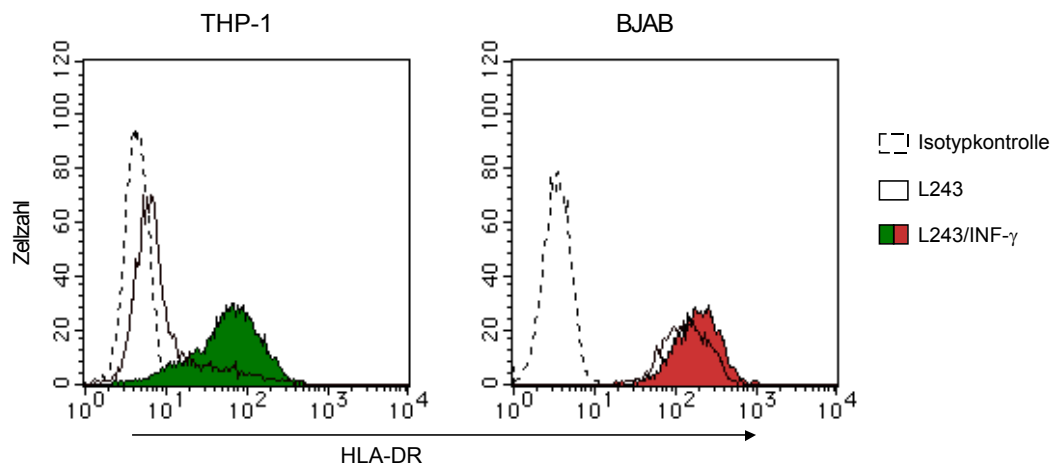


Abbildung 8: Unterschiedliche Oberflächenexpression von HLA-DR-Molekülen auf einer monozytären und einer B-Lymphom-Zelllinie. Die Histogramme zeigen die FACS-Analyse der unstimulierten oder mit $\text{INF-}\gamma$ stimulierten THP-1- und BJAB-Zellen. Die Zellen wurden sowohl mit einer Isotypkontrolle als auch mit dem monoklonalen Antikörper L243 gefärbt. Die Stimulation der Zellen erfolgte für 48h mit $\text{INF-}\gamma$.

Tabelle 8: Anteil HLA-DR-positiver und mittlere Fluoreszenzintensitäten unterschiedlich stimulierter THP-1-Zellen

Stimuli	Konzentration	HLA-DR-positive	
		Zellen [%]	mFI
ohne	-	15,8	42,0
TGF- β 1	20ng/ml	17,5	27,0
cAMP	100 μ M	14,5	34,9
LPS	10 μ g/ml	15,5	39,8
IL-1 β	5ng/ml	16,2	41,2
Vitamin D ₃	250ng/ml	15,6	42,1
TPA	1nM	15,7	44,9
TNF- α	1000U/ml	16,3	45,1
GM-CSF	1000U/ml	18,1	47,8
IL-4	20U/ml	17,6	48,5
INF- γ	1000U/ml	96,9	131,6

Tabelle 9: Mittlere Fluoreszenzintensitäten unterschiedlich stimulierter BJAB-Zellen

Stimuli	Konzentration	mFI
ohne	-	153,4
anti-CD40/anti-IgM	je 5 μ g/ml	105,5
cAMP	100 μ M	129,8
TGF- β 1	20ng/ml	131,2
Vitamin D ₃	250ng/ml	138,9
LPS	10 μ g/ml	142,3
IL-4	20U/ml	175,6
TPA	1nM	177,0
IL-1 β	5ng/ml	181,2
INF- γ	1000U/ml	208,0

Eine Stimulation mit TGF- β 1, cAMP, LPS, IL-1 β , Vitamin D₃, TPA, TNF- α , GM-CSF oder IL-4 induziert die THP-1-Zellen dagegen nicht bzw. unwesentlich (siehe Tabelle 8). Im Unterschied dazu waren die BJAB-Zellen ohne oder mit INF- γ -Stimulation zu 100% HLA-DR-positiv. Durch die Stimulation mit INF- γ wurde lediglich die mittlere Fluoreszenzintensität (mFI) von 153,4 auf 208,0 erhöht. Diese Verschiebung konnte weder durch anti-CD40/anti-IgM noch durch cAMP, TGF- β 1, Vitamin D₃ oder LPS erreicht werden. IL-4, TPA oder IL-1 β hingegen erhöhten die mFI leicht (siehe Tabelle 9).

3.3 Unterschiedliche transkriptionelle Aktivitäten der Promotoren des DR53-Locus in den Zelllinien THP-1 und BJAB

Im nächsten Schritt wurde betrachtet, ob die Sequenzunterschiede in der Promotorregion der drei Haplotypen mit ihren insgesamt fünf funktionellen DRB-Genen zu unterschiedlichen transkriptionellen Aktivitäten in der monozytären Zelllinie THP-1 und in der B-Lymphom-Zelllinie BJAB führen. Dazu wurden die Promotoraktivitäten der folgenden Gene bestimmt: DR4, DR7, DR9, DRB4A und DRB4B. Die je 257bp umfassenden Promotorsequenzen, welche die S-, X-, Y-, CCAAT- und TATA-Boxen einschließen (siehe Abbildung 5), wurden zunächst amplifiziert (siehe 2.2.1 und 2.2.3). Dazu wurde auf die DNA der Individuen zurückgegriffen, deren Sequenzanalyse in Kapitel 3.1 ergeben hatte, daß sie für den jeweiligen Promotor homozygot positiv waren. Die PCR-Produkte wurden anschließend in den Reportervektor pGL3, der das Luziferasegen als Reportergen besitzt, eingefügt (siehe 2.2.4 und 2.2.5). Im Anschluß daran wurden die unterschiedlichen pGL3-Vektoren und der pCMV β -Vektor, der als Transfektionskontrolle dient, in *E. coli*-Zellen transformiert (siehe 2.2.6). Mit den erfolgreich transformierten Zellen wurde danach durch die Plasmidpräparation genügend DNA für die folgende Transfektion hergestellt (siehe 2.2.7). Die pGL3-Vektoren mit den fünf unterschiedlichen Promotorkonstrukten sowie der pGL3-Vektor ohne Promotor als Standard wurden transient mit dem pCMV β -Vektor, der für die β -Galaktosidase kodiert, in die beiden Zelllinien THP-1 und BJAB transfiziert (siehe 2.2.10). Die Bestimmung der transkriptionellen Aktivitäten der fünf verschiedenen Promotorkonstrukte wurde über die Aktivitätsbestimmung der Luziferase und der β -Galaktosidase ermittelt (siehe 2.2.11 und 2.2.12).

Die einzelnen Promotoraktivitäten in der monozytären Zelllinie THP-1 und in der B-Lymphom-Zelllinie BJAB sind in Abbildung 9 wiedergegeben. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis einer Messung. Weitere Messungen unterschieden sich lediglich im Vergleich zum Standard (pGL3-Vektor ohne Promotor), wohingegen die Verhältnisse der spezifischen Promotoraktivitäten untereinander gleich waren. Für die THP-1-Zellen zeigte sich, daß der DR4-Promotor mit dem Wert 12 für die relative Luziferaseaktivität die geringste transkriptionelle Aktivität besaß. Die Werte für die Promotoraktivitäten von DR7, DR9 und DRB4A sind mit den Werten 26, 29 und 27 vergleichbar und damit 2,2- bis 2,4fach höher als der Wert vom DR4-Promotor. Der DRB4B-Promotor besitzt mit dem Wert 97 die höchste Aktivität in der THP-1-Zelllinie und ist damit achtfach höher als der Wert vom DR4-Promotor.

Dagegen variierten die Werte für die Promotoraktivitäten in der BJAB-Zelllinie lediglich zwischen 15 und 28. Hier besaß der DR4-Promotor mit dem Wert 28 die höchste transkriptionelle Aktivität, während der DRB4A-Promotor mit dem Wert 15 die geringste Aktivität aufwies und damit etwa die Hälfte des DR4-Promotors. Die Promotoraktivitäten von DR7, DR9 und DRB4B lagen mit den Werten 18, 20 und 25 dazwischen.

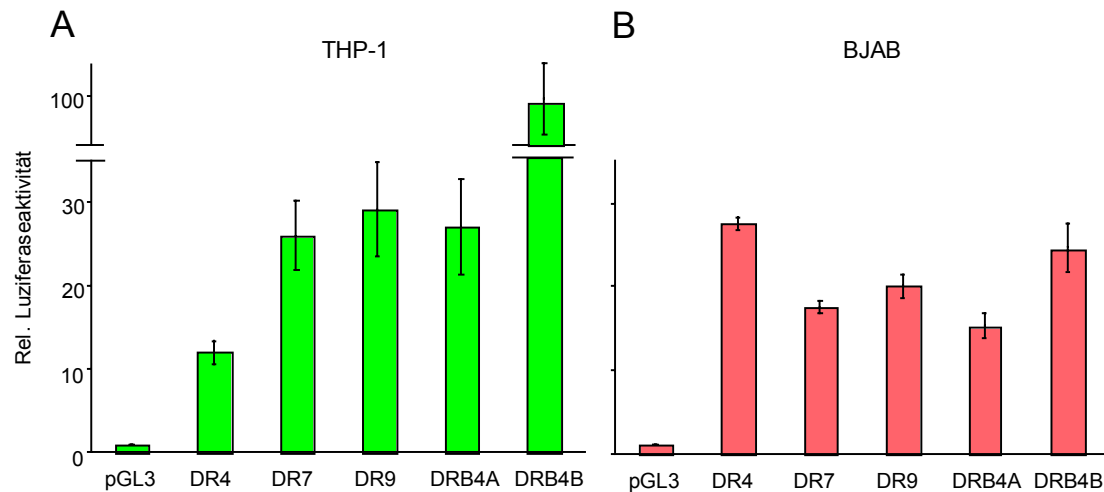


Abbildung 9: Unterschiedliche transkriptionelle Aktivitäten der Promotoren des DR53-Locus in THP-1 (A) und BJAB (B). Die transkriptionellen Aktivitäten wurden durch die Aktivitätsbestimmung der Luziferase und der β -Galaktosidase ermittelt. Die Aktivitäten wurden 6h (THP-1) bzw. 22h (BJAB) nach der Transfektion im Luminometer bzw. im ELISA-Reader bestimmt. Gezeigt werden Mittelwerte aus je zwei Messungen mit den jeweiligen Standardabweichungen.

3.4 Unterschiedliches Bindungsverhalten von Zellkernlysaten an die einzelnen Promotorabschnitte des DR53-Locus

In diesem Kapitel soll das Bindungsverhalten der Zellkernlysate der monozytären Zelllinie THP-1 und der B-Lymphom-Zelllinie BJAB an die einzelnen Boxen der unterschiedlichen Promotoren des DR53-Locus untersucht werden. Möglicherweise lassen sich damit Rückschlüsse auf die gemessenen Promotoraktivitäten bzw. die HLA-DR-Oberflächenexpression ziehen. Dazu wurden die Promotorsequenzen von DR4, DR7, DR9, DRB4A und DRB4B miteinander verglichen und doppelsträngige Oligonukleotide gewählt, die jeweils die S-, X-, Y-, CCAAT- oder TATA-Box abdecken. Die beiden Zelllinien wurden für diese Versuche mit mehreren Substanzen stimuliert (siehe Tabelle 5), von denen bekannt ist, daß sie die HLA-DR-Expression über die Konzentration der Transkriptionsfaktoren beeinflussen [38]. Danach wurden von diesen Zellen Zellkernlysate hergestellt und deren Proteingehalt bestimmt (siehe 2.2.13 und 2.2.14). Die Interaktion der unterschiedlichen Promotor-Oligonukleotide mit den Zellkernlysaten wurde mit Hilfe der SPR charakterisiert (siehe 2.2.15), bzw. durch einen kompetitiven EMSA bestätigt (siehe 2.2.16).

3.4.1 Vergleichbares Bindungsverhalten der Zellkernextrakte an die unterschiedlichen CCAAT-Boxen des DR53-Locus

Abbildung 10A stellt die 26bp umfassende CCAAT-Box-Sequenzen der Promotoren von DR4, DR7, DR9, DRB4A und DRB4B dar. Die Box selbst ist hochgradig konserviert, lediglich an den flankierenden Positionen gibt es Unterschiede. Die Sequenzen von DR7 und DR9 sind identisch und unterscheiden sich von DR4 nur durch ein Basenpaar. DRB4A und –B sind ebenfalls identisch, unterscheiden sich aber an drei Positionen von DR4. Die Abbildung 10B zeigt auf der linken Seite spezifische wenn auch schwache Bindungen der THP-1-Zellkernlysate an die drei unterschiedlichen Sequenzen der CCAAT-Box. Die relativen Bindungsaffinitäten, die in % Resonance Units (%RU) angegeben sind, sind mit 104 bis 110%RU vergleichbar. Die Bindung der BJAB-Zellkernlysate an die drei Sequenzen sind mit je 101%RU noch schwächer (siehe Abbildung 10B, rechte Seite). Die beiden Zelllinien wurden ferner noch mit INF- γ , TGF- β 1, Vitamin D₃ oder IL-1 β stimuliert, jedoch konnte keine Erhöhung der Bindungsaffinitäten bzw. der Konzentrationen der Transkriptionsfaktoren erzielt werden (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Relative Bindungsaffinitäten unterschiedlich stimulierter THP-1- und BJAB-Zellkernlysate an die einzelnen CCAAT-Box-Oligonukleotide

	INF- γ	Vitamin D ₃	IL-1 β	TGF- β 1
THP-1				
Random	100	100	100	100
DR4	107,2 \pm 0,5	106,9 \pm 0,8	104,9 \pm 1,4	102,3 \pm 0,3
DR7/DR9	106,2 \pm 0,6	105,7 \pm 0,8	103,4 \pm 1,3	101,5 \pm 0,1
DRB4	104,0 \pm 0,5	101,0 \pm 0,5	101,0 \pm 0,5	101,0 \pm 0,5
BJAB				
Random	100	100	100	100
DR4	101,1 \pm 0,1	100,5 \pm 0,1	100,6 \pm 0,1	100,2 \pm 0,1
DR7/DR9	100,2 \pm 0,1	100,4 \pm 0,1	100,0 \pm 0,0	99,4 \pm 0,0
DRB4	101,0 \pm 0,1	101,3 \pm 0,1	101,3 \pm 0,1	100,8 \pm 0,1

aufgeführt sind Mittelwerte mit ihren jeweiligen Standardabweichungen

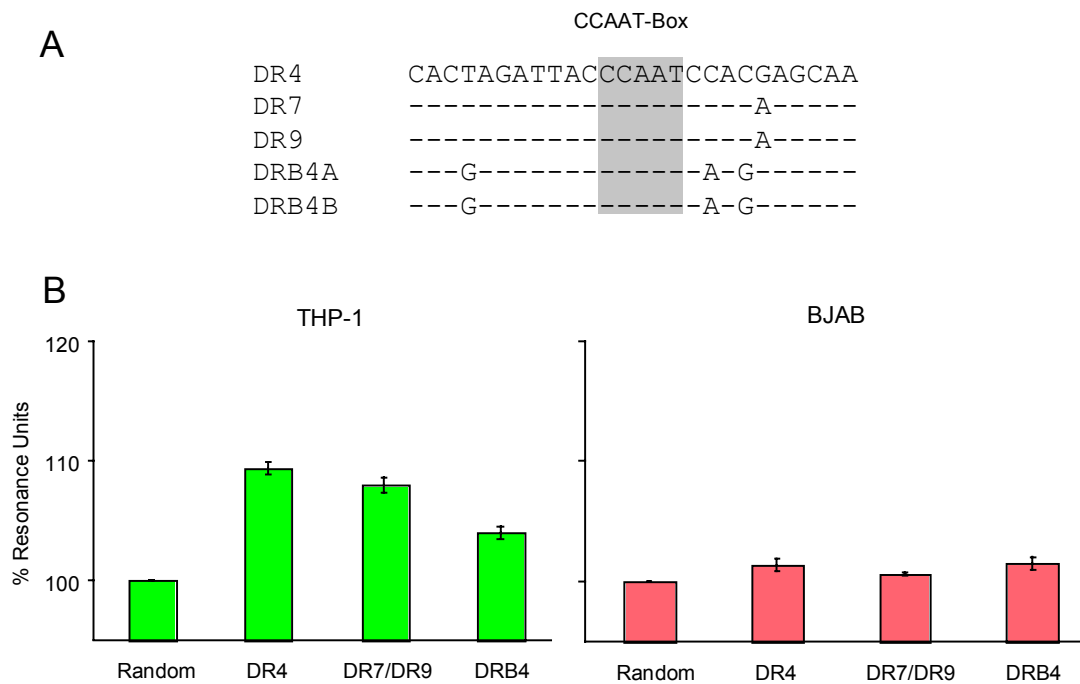


Abbildung 10: Vergleichbare Bindungsaffinitäten der Zellkernlysate an die einzelnen Promotoren der CCAAT-Boxen. A zeigt die Promotorsequenzen der DR4-, DR7-, DR9-, DRB4A- und -B-Allele, dabei sind die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren grau unterlegt, die Unterschiede zwischen den Sequenzen sind angezeigt. B: Die Balken repräsentieren die jeweiligen Bindungsaffinitäten von THP-1- und BJAB-Zellkernlysaten an die Promotorregionen der CCAAT-Boxen von DR4, DR7/DR9 und DRB4. Das Bindungsverhalten wurde durch SPR bestimmt und auf die unspezifische DNA (Random) bezogen. Die Balken zeigen Mittelwerte aus je zwei Messungen mit ihren jeweiligen Standardabweichungen.

3.4.2 Ähnliches Bindungsverhalten der Zellkernlysate an die verschiedenen vom DR53-Locus kodierten S-Boxen

Die S-Box-Sequenzen für die einzelnen Promotoren des DR53-Locus sind in Abbildung 11A gezeigt. Der Polymorphismus der S-Box besteht nur in der Box selbst, nicht in den flankierenden Bereichen. Die Sequenzen von DR7 und DR9 unterscheiden sich von der DR4-Sequenz durch ein Basenpaar. Die beiden DRB4-Promotoren zeigen keine Unterschiede in der S-Box, sie unterscheiden sich von der DR7- und DR9-Sequenz durch ein weiteres Basenpaar. Die relativen Bindungsaffinitäten der THP-1- und BJAB-Zellkernextrakte zu den drei verschiedenen Promotorsequenzen werden durch die Balken in Abbildung 11 B verdeutlicht. Es zeigt sich wiederum, daß das Bindungsverhalten an die S-Box nur geringfügig variiert, die Werte für THP-1 liegen zwischen 119 und 124%RU, die für BJAB zwischen 114 und 120%RU. Durch die Stimulation mit INF- γ , TPA, und cAMP wurden die Bindungsaffinitäten bzw. die Konzentrationen der Transkriptionsfaktoren nicht wesentlich verändert (siehe Tabelle 11).

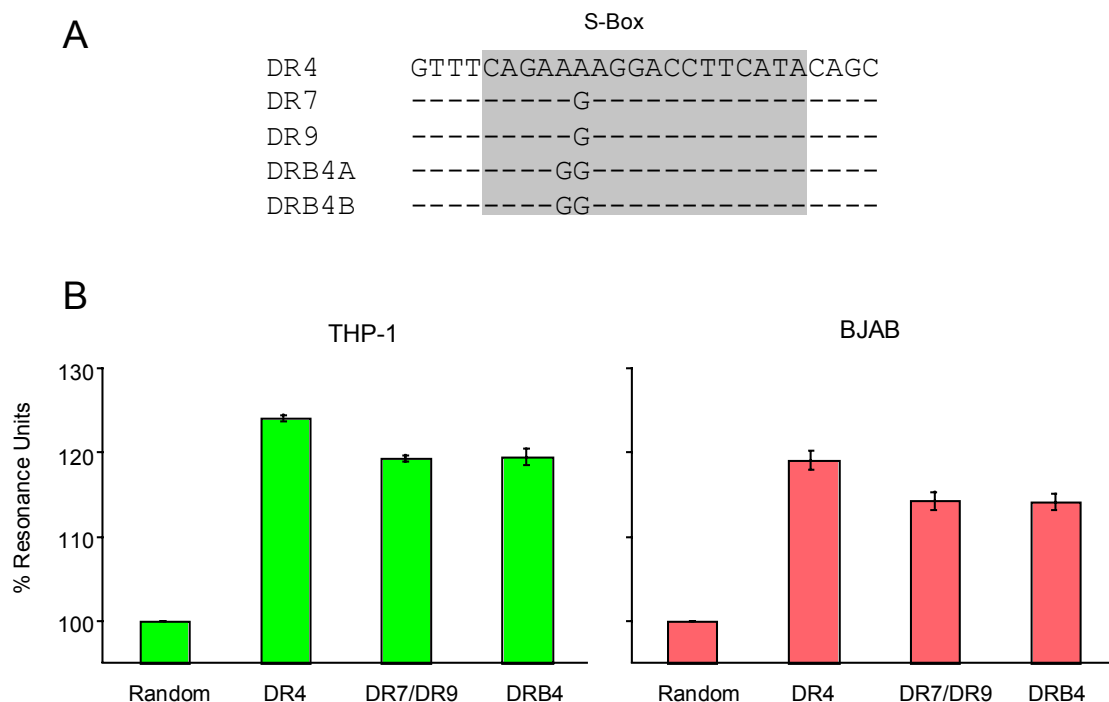


Abbildung 11: Vergleichbare Bindungsaffinitäten der Zellkernlysate an die einzelnen Promotoren der S-Boxen. A zeigt die Promotorsequenzen der DR4-, DR7-, DR9-, DRB4A- und -B-Allele, dabei sind die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren grau unterlegt, die Unterschiede zwischen den Sequenzen sind angezeigt. B: Die Balken repräsentieren die jeweiligen Bindungsaffinitäten von THP-1- und BJAB-Zellkernlysaten an die Promotorregionen der S-Boxen von DR4, DR7/DR9 und DRB4. Das Bindungsverhalten wurde gemäß der Legende von Abbildung 10 bestimmt.

Tabelle 11: Relative Bindungsaffinitäten unterschiedlich stimulierter THP-1- und BJAB-Zellkernlysate an die einzelnen S-Box-Oligonukleotide

	INF- γ	cAMP	TPA
THP-1			
Random	100	100	100
DR4	123,0 \pm 0,8	110,9 \pm 0,5	107,8 \pm 1,0
DR7/DR9	116,7 \pm 1,1	108,4 \pm 1,0	106,7 \pm 1,0
DRB4	119,8 \pm 0,8	108,8 \pm 1,5	106,4 \pm 1,0
BJAB			
Random	100	100	100
DR4	118,1 \pm 1,4	109,5 \pm 1,6	110,7 \pm 1,1
DR7/DR9	113,3 \pm 1,8	108,0 \pm 1,3	108,9 \pm 1,2
DRB4	114,6 \pm 1,7	112,3 \pm 4,2	107,8 \pm 0,0

aufgeführt sind Mittelwerte mit ihren jeweiligen Standardabweichungen

3.4.3 Unterschiedliche Bindungen der Zellkernextrakte an die Y-Boxen von DRB1 und DRB4

Der Polymorphismus im Promotorbereich der Y-Box ist für die fünf Promotoren des DR53-Locus in Abbildung 12A gezeigt. Die Sequenzen von DR4, DR7 und DR9 sind für diesen Bereich gleich. Zu den beiden DRB4-Promotorsequenzen gibt es zwei Unterschiede, die innerhalb der Y-Box liegen. Darüber hinaus unterscheiden sich die Sequenzen von DRB4A und -B an einer Position 3' der Y-Box. Die relativen Bindungsaffinitäten von THP-1- und BJAB-Zellkernlysaten zum DRB1-Oligonukleotid sind mit 168 bzw. 169%RU am stärksten (siehe Abbildung 12B). Im Gegensatz dazu betragen die relativen Bindungsaffinitäten zu den DRB4-Oligonukleotiden lediglich 122% (DRB4A) und 136%RU (DRB4B) für THP-1 bzw. 114%RU (DRB4A und -B) für BJAB. Auch hier konnte durch die Stimulation mit INF- γ , TGF- β 1, Vitamin D₃ oder IL-1 β in den beiden Zelllinien im allgemeinen keine Erhöhung der spezifischen Bindung bzw. der Konzentrationen der Transkriptionsfaktoren erreicht werden (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Relative Bindungsaffinitäten unterschiedlich stimulierter THP-1- und BJAB-Zellkernlysate an die einzelnen Y-Box-Oligonukleotide

	INF- γ	Vitamin D ₃	IL-1 β	TGF- β 1
THP-1				
Random	100	100	100	100
DR4/DR7/DR9	163,1 \pm 4,2	161,1 \pm 0,8	150,3 \pm 1,4	146,2 \pm 2,8
DRB4A	120,9 \pm 1,7	110,1 \pm 0,8	112,8 \pm 1,4	112,4 \pm 0,0
DRB4B	132,6 \pm 1,1	134,1 \pm 6,5	129,0 \pm 2,2	123,5 \pm 1,9
BJAB				
Random	100	100	100	100
DR4/DR7/DR9	145,2 \pm 6,2	148,4 \pm 3,7	149,6 \pm 0,0	140,3 \pm 5,5
DRB4A	114,1 \pm 0,5	110,9 \pm 1,4	99,83 \pm 1,1	109,5 \pm 0,5
DRB4B	110,2 \pm 1,2	118,1 \pm 2,6	102,2 \pm 1,7	98,9 \pm 3,5

aufgeführt sind Mittelwerte mit ihren jeweiligen Standardabweichungen

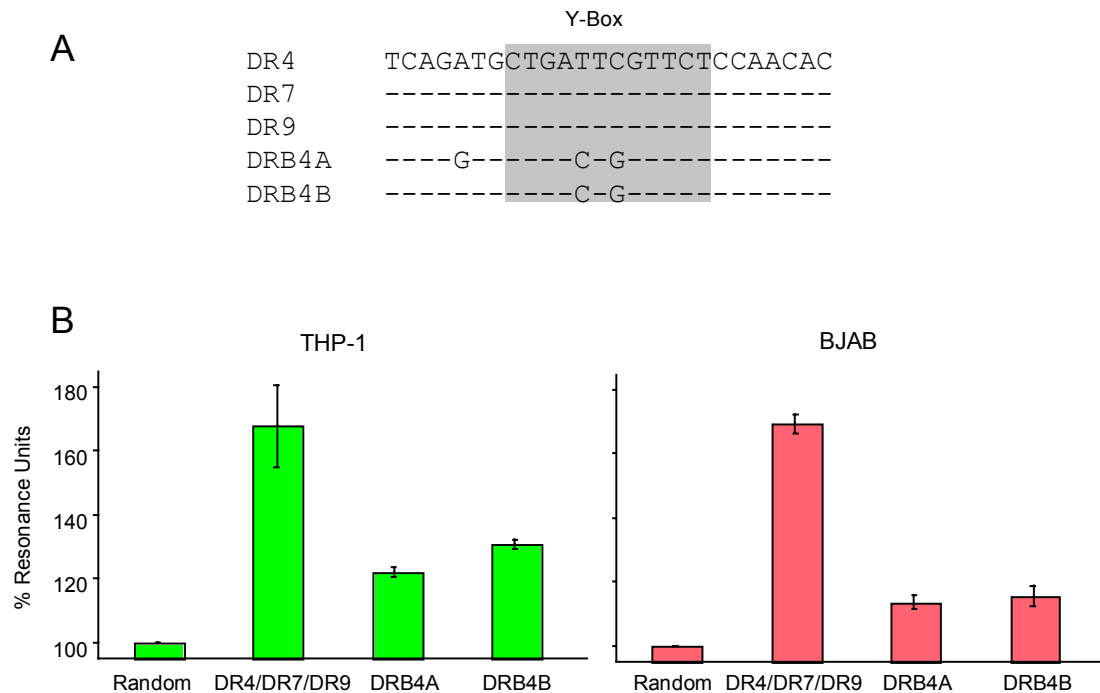


Abbildung 12: Unterschiedliches Bindungsverhalten der Zellkernlysate an die Y-Boxen von DRB1 und DRB4. A zeigt die Promotorsequenzen der DR4-, DR7-, DR9-, DRB4A- und -B-Allele, dabei sind die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren grau unterlegt, Unterschiede zwischen den Sequenzen sind angezeigt. B: Die Balken repräsentieren die jeweiligen Bindungsaffinitäten von THP-1- und BJAB-Zellkernlysaten an die Promotorregionen der Y-Boxen von DR4/DR7/DR9, DRB4A und DRB4B. Das Bindungsverhalten wurde gemäß der Legende von Abbildung 10 bestimmt.

3.4.4 Vermittlung der differentiellen Expression von DRB4A und DRB4B durch die TATA-Box

Der Vergleich der unterschiedlichen TATA-Box-Sequenzen ist in Abbildung 13A wiedergegeben. Während die TATA-Box selbst komplett konserviert ist, gibt es sowohl 5' als auch 3' der Box Unterschiede. Die Promotorsequenzen von DR4 und DR7 sind identisch, wobei sie sich im Vergleich zu DR9 in einem Basenpaar unterscheiden. Den gleichen Unterschied sieht man auch bei der DRB4B-Sequenz. Zusätzlich besitzen die beiden DRB4-Sequenzen 5' zwei Substitutionen, die sie von den DRB1-Sequenzen unterscheiden. Die relativen Bindungsaffinitäten sind sowohl für die THP-1- als auch die BJAB-Zellkernextrakte zum DRB4B-Promotor am höchsten (203 bzw. 183%RU) und zum DRB4A-Promotor am geringsten (126 bzw. 106%RU). Die Bindungen der Zellkernextrakte an die beiden DRB1-Oligonukleotide liegen für THP-1 zwischen 174 und 179%RU und für BJAB zwischen 155 und 168%RU. Durch die Stimulation mit 1000U/ml INF- γ wurden die Bindungsaffinitäten der BJAB-Zellkernlysate zu den DRB4-Oligonukleotiden um 5% (DRB4A) bis 10% (DRB4B) sowie zu den DRB1-Oligonukleotiden um 29% (DR9) bis 37% (DR4/DR7) erhöht.

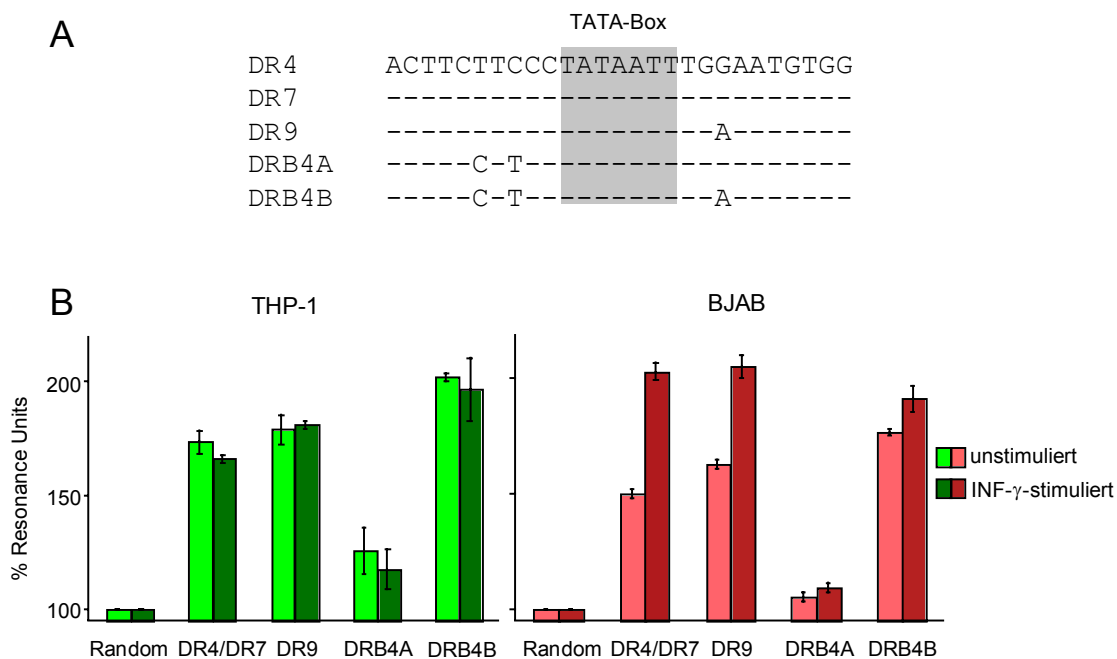


Abbildung 13: Vermittlung der differentiellen Expression von DRB4A und -B durch die TATA-Box. A zeigt die Promotorsequenzen der DR4-, DR7-, DR9-, DRB4A- und -B-Allele, dabei sind die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren grau unterlegt, Unterschiede zwischen den Sequenzen sind angezeigt. B: Die Balken repräsentieren die jeweiligen Bindungsaffinitäten von THP-1- und BJAB-Zellkernlysaten an die Promotorregionen der TATA-Boxen von DR4/DR7, DR9, DRB4A und DRB4B. Das Bindungsverhalten wurde gemäß der Legende von Abbildung 10 bestimmt. Die hellen Balken zeigen die unstimulierten Zellen, die dunklen Balken die für 48h mit 1000U/ml INF- γ stimulierten Zellen.

Tabelle 13: Relative Bindungsaffinitäten unterschiedlich stimulierter THP-1- und BJAB-Zellkernlysate an die einzelnen TATA-Box-Oligonukleotide

	cAMP	TPA
THP-1		
Random	100	100
DR4/DR7	166,2 ± 2,4	188,3 ± 1,9
DR9	183,0 ± 1,5	190,5 ± 0,4
DRB4A	119,5 ± 4,9	123,1 ± 0,5
DRB4B	193,6 ± 6,0	216,7 ± 0,5
BJAB		
Random	100	100
DR4/DR7	168,2 ± 2,0	184,4 ± 4,2
DR9	165,4 ± 0,9	185,9 ± 4,7
DRB4A	106,1 ± 1,1	101,0 ± 2,4
DRB4B	176,2 ± 1,0	186,0 ± 3,4

aufgeführt sind Mittelwerte mit ihren jeweiligen Standardabweichungen

Für die Zelllinie THP-1 konnte weder durch die Stimulation mit INF- γ noch mit cAMP eine Veränderung des Bindungsverhaltens erzielt werden, durch 1nM TPA war hingegen eine minimale Erhöhung der Bindungsaffinitäten bzw. der Konzentrationen der Transkriptionsfaktoren zu verzeichnen (siehe Tabelle 13). Eine geringfügige Erhöhung der Bindungsaffinitäten der BJAB-Zellkernlysate konnte ebenfalls durch 1nM TPA beobachtet werden, wohingegen cAMP keinen Effekt auf die Bindungen der BJAB-Zellkernextrakte hatte (siehe Tabelle 13).

Die Ergebnisse hinsichtlich des unterschiedlichen Bindungsverhaltens der BJAB-Zellkernlysate an die TATA-Box-Sequenzen von DRB4A und -B konnte durch eine Kompetitionsanalyse mittels EMSA bestätigt werden. Dazu kompetierten die beiden mit 32 P-markierten DRB4-Sequenzen jeweils mit unmarkierten DRB4A- und DRB4B-Oligonukleotiden um die Bindung an die Zellkernlysate (siehe 2.2.16). Das Polyacrylamidgel des EMSAs zeigt eine schnellere Abnahme der Signalstärke für die obere Bande, wenn die radioaktivmarkierte TATA-DRB4B-Sequenz mit unmarkiertem TATA-DRB4B-Oligonukleotiden verdrängt wurde (siehe Abbildung 14). Die Abbildung 15 zeigt den gleichen Versuch mit 32 P-markiertem TATA-DRB4A. Hier wurden die oberen Banden durch den Phosphorimager quantifiziert und deren Signalstärke aufgetragen. Hier war ebenfalls eine schnellere Abnahme der Signalstärke zu erkennen, wenn das radioaktivmarkierte Oligonukleotid durch das unmarkierte TATA-DRB4B-Oligonukleotid verdrängt wurde.

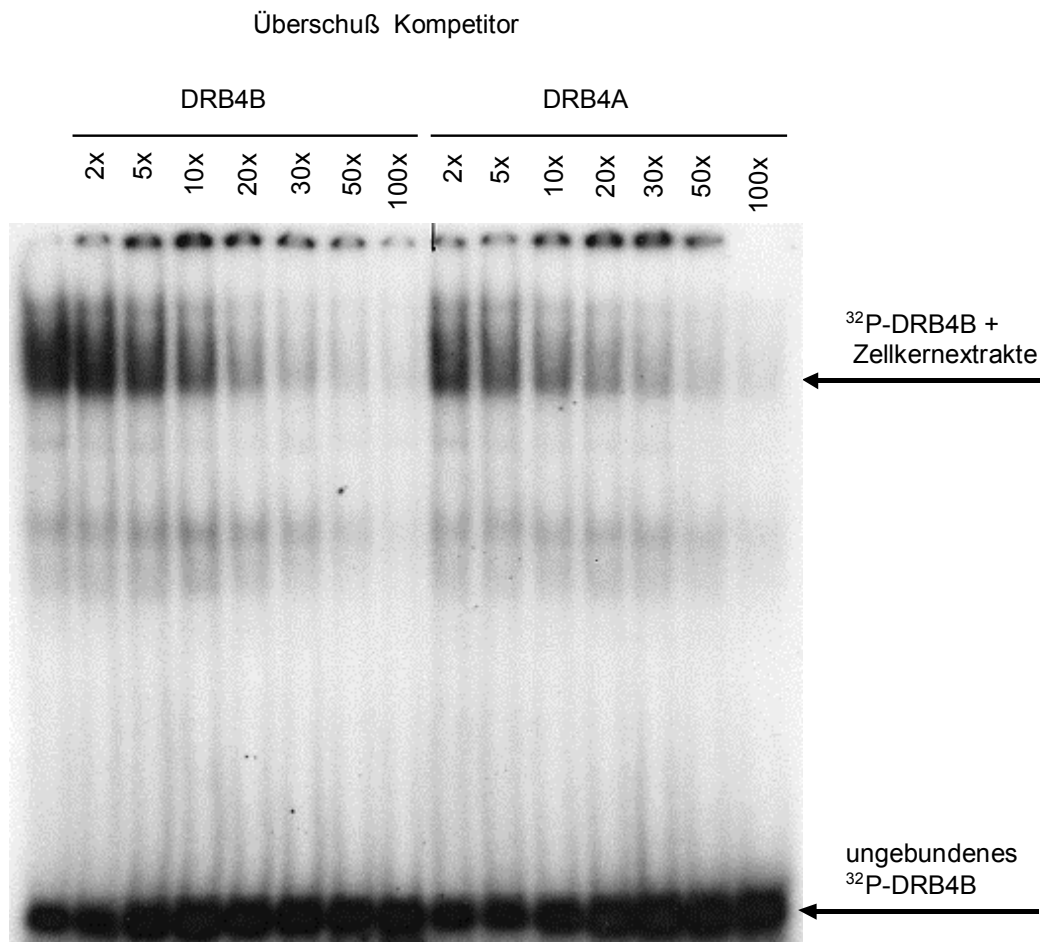


Abbildung 14: Kompetitionsanalyse mittels EMSA für das Bindungsverhalten von BJAB-Zellkernlysaten an die TATA-Box von DRB4B. Das Polyacrylamid-Gel zeigt die Konkurrenz von markiertem TATA-Box-DRB4B mit steigenden Konzentrationen von unmarkiertem TATA-Box-DRB4A und -B.

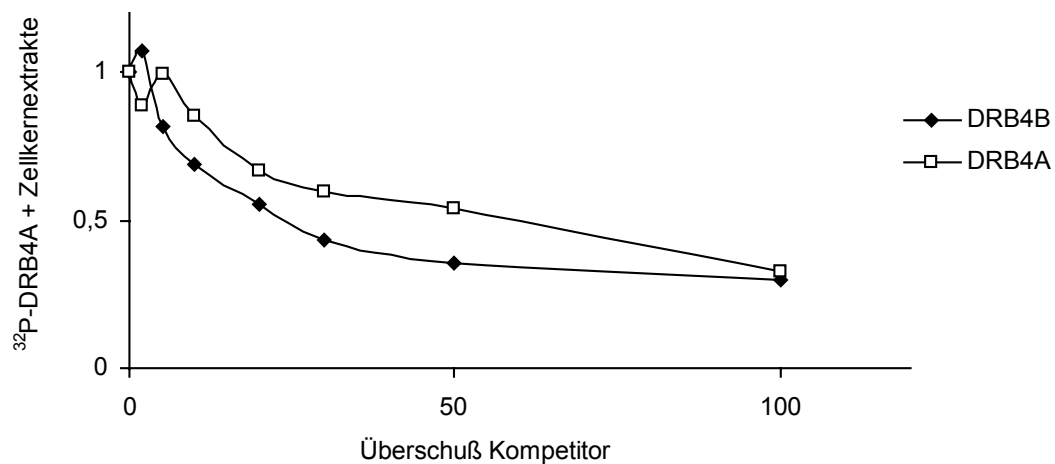


Abbildung 15: Kompetitionsanalyse mittels EMSA für das Bindungsverhalten von BJAB-Zellkernlysaten an die TATA-Box von DRB4A. Mittels Phosphoimager wurde die Intensität der oberen Bande des Polyacrylamid-Gels bestimmt und auf die jeweilige Gesamtintensität der Spur bezogen. Die Kurve zeigt die Abnahme der Signalstärke von der Competition zwischen markierter TATA-Box-DRB4A und unmarkierten DRB4-Oligonukleotiden an die BJAB-Zellkernlysate. Die Signalstärke der Bindung ohne Competition wurde 1 gesetzt, alle anderen Werte wurden in Verhältnis dazu gesetzt.

3.4.5 INF- γ -Stimulation der HLA-DR-Expression wird in den Monozyten durch die X-Box vermittelt

Abbildung 16A zeigt die X-Box-Sequenzen der Promotoren von DR4, DR7, DR9, DRB4A und DRB4B. Die DR4-Sequenz unterscheidet sich von den DR7- und DR9-Sequenzen durch eine Substitution 3' der X2-Box. Die Sequenzen der DRB4-Promotoren sind identisch, unterscheiden sich aber im Vergleich zu DR4 durch eine Substitution innerhalb der X1-Box und zwei Substitutionen 3' der X2-Box. Die Sequenz von DRA hingegen weicht sehr stark von den Sequenzen der DRB-Promotoren ab. Die Bindungen der Zellkernlysate von THP-1 und BJAB sind zum X-Box-DRA-Oligonukleotid am stärksten (132 bzw. 191%RU). Die relativen Bindungsaffinitäten zu den DRB-Oligonukleotiden liegen für THP-1 zwischen 106 und 109%RU und für BJAB zwischen 117 und 126%RU (siehe Abbildung 16B). Durch die Stimulation mit INF- γ wurden alle Bindungsaffinitäten der THP-1-Zellkernextrakte zu den Oligonukleotiden erhöht, zu DR7 und DR9 auf 126, zu DRB4 auf 139, zu DR4 auf 149 und zu DRA auf 215%RU.

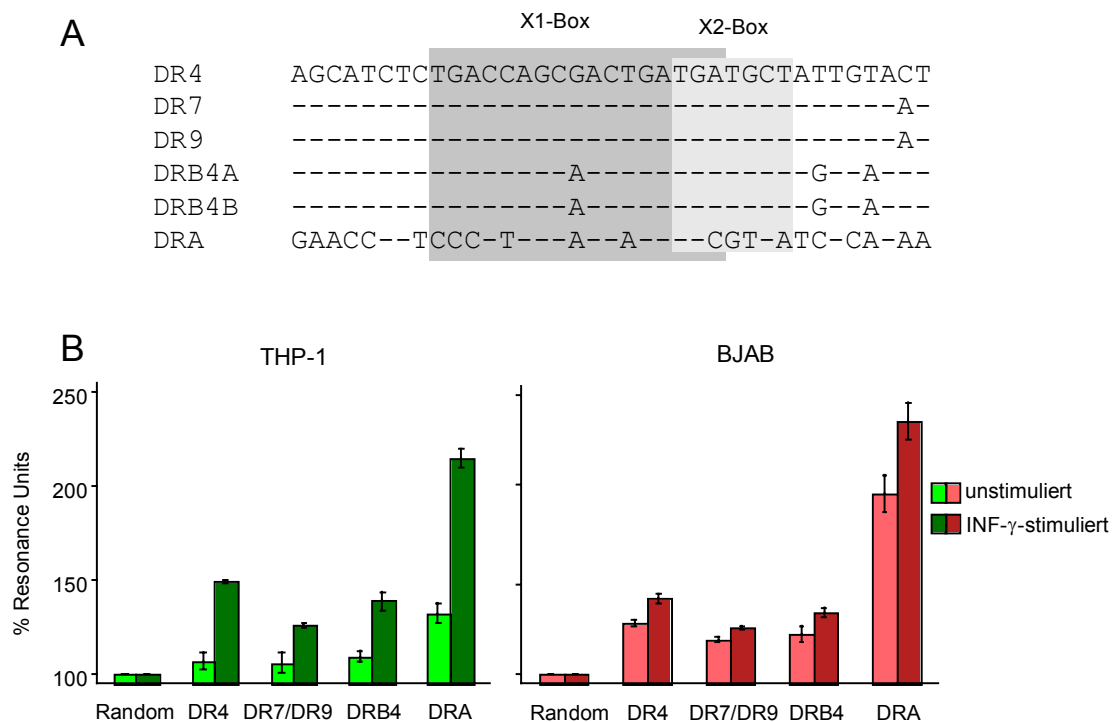


Abbildung 16: Vermittlung der INF- γ -Stimulation der HLA-DR-Expression der Monozyten durch die X-Box. A zeigt die Promotorsequenzen der DR4-, DR7-, DR9-, DRB4A-, DRB4B- und DRA-Allele, dabei sind die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren grau unterlegt, die Unterschiede zwischen den Sequenzen sind angezeigt. B: Die Balken repräsentieren die jeweiligen Bindungsaffinitäten von THP-1- und BJAB-Zellkernlysaten an die Promotorregionen der X-Boxen von DR4, DR7/DR9, DRB4 und DRA. Das Bindungsverhalten wurde gemäß der Legende von Abbildung 10 bestimmt. Die hellen Balken zeigen die unstimulierten Zellen, die dunklen Balken die für 48h mit 1000U/ml INF- γ stimulierten Zellen.

Tabelle 14: Relative Bindungsaffinitäten unterschiedlich stimulierter THP-1- und BJAB-Zellkernlysate an die einzelnen X-Box-Oligonukleotide

	cAMP	TPA	TGF- β 1
THP-1			
Random	100	100	100
DR4	100,0 \pm 0,0	139,1 \pm 0,4	125,0 \pm 0,0
DR7/DR9	104,0 \pm 0,3	117,0 \pm 0,9	118,0 \pm 1,3
DRB4	114,8 \pm 1,9	139,5 \pm 0,5	115,0 \pm 0,0
DRA	128,9 \pm 3,1	141,9 \pm 3,6	144,0 \pm 0,7
BJAB			
Random	100	100	100
DR4	120,3 \pm 0,0	121,2 \pm 0,4	132,0 \pm 0,0
DR7/DR9	104,0 \pm 0,3	122,0 \pm 0,9	118,0 \pm 1,3
DRB4	120,6 \pm 1,9	122,2 \pm 0,5	125,0 \pm 0,0
DRA	142,9 \pm 3,1	173,7 \pm 3,6	177,0 \pm 0,7

aufgeführt sind Mittelwerte mit ihren jeweiligen Standardabweichungen

Für die BJAB-Zellkernlysate war die Zunahme der Bindungsaffinitäten durch die INF- γ -Stimulation nicht ganz so stark, der Effekt war aber wiederum bei DRA am stärksten. Die Stimulation mit cAMP erbrachte für beide Zelllinien keine Zunahme der Bindungsaffinitäten, durch die Stimulation mit 1nM TPA konnte nur das Bindungsverhalten zu den THP-1-Zellkernextrakten leicht verbessert werden, durch TGF- β 1 konnte hingegen nur bei den BJAB-Zellkernlysaten eine leichte Steigerung der Bindungsaffinitäten bzw. der Konzentrationen der Transkriptionsfaktoren verzeichnet werden (siehe Tabelle 14).

3.5 Assoziation des DRB4B-Promotors mit einem schweren Krankheitsverlauf der RA

Im letzten Schritt wurde untersucht, ob die gefundenen strukturellen und funktionellen Unterschiede zwischen den Promotoren mit dem Krankheitsverlauf der RA korrelieren. Dazu wurden die DNA-Proben der 32 RA-Patienten, bei denen die Konzentration vom C-reaktiven Protein (CRP) im Serum zu Beginn der Erkrankung gemessen wurde, dahingehend analysiert, ob sie mit dem DRB4B-Promotor oder mit der DRB4-Spleißvariante assoziiert waren (siehe Tabelle 6). Ein hohe CRP-Konzentration ($\geq 15\text{mg/l}$) stellt dabei ein hohes Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf der RA dar [8]. Nach der Aufteilung der RA-Patienten in je eine Gruppe mit einer höheren und einer niedrigeren CRP-Konzentration zu Beginn der RA wurden ihre Assoziationen mit dem DRB4B-Promotor und der DRB4-Spleißvariante betrachtet. Dabei waren die Häufigkeiten der DR4-, DR7- und DR9-Allele ähnlich über die beiden Patientengruppen verteilt, lediglich die Häufigkeit des DR4-Allels war in der Patientengruppe mit einer höheren CRP-Konzentration leicht erhöht (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Eine erhöhte DRB4-Expression ist mit einem schweren Krankheitsverlauf der RA verbunden

Patienten	Häufigkeiten der HLA-Allele	CRP zu Beginn	Assoziation der HLA-Allele DR4, DR7 und DR9 mit DRB4B	Assoziation des HLA-DRB4A-Allels mit der DRB4-Spleißvariante
n=15	DR4: 37%	$\geq 15\text{mg/l}$	41%*	10%
	DR7: 33%			
	DR9: 7%			
n=17	DR4: 29%	<15mg/l	10%*	33%
	DR7: 35%			
	DR9: 6%			

* die Differenz über 31% ist mit Sicherheitsintervallen von 0,7-71% statistisch signifikant

Die Assoziation mit dem DRB4B-Promotor in der Gruppe mit einer höheren CRP-Konzentration ist mit 41% deutlich höher als in der Gruppe mit einer niedrigeren CRP-Konzentration (10%). Die Differenz über 31% ist mit Sicherheitsintervallen von 0,5 – 71% statistisch signifikant. Ferner war die DRB4-Spleißvariante bei 6 von 18 DRB4A-Allelen (33%) unter der Patientengruppe mit einer CRP-Konzentration $\geq 15\text{mg/l}$ zu finden. Dagegen befand sich nur 1 von 10 DRB4A-Allelen (10%) in der Gruppe der RA-Patienten mit einer CRP-Konzentration <15mg/l. Die Differenz beträgt 21%, sie ist aber aufgrund der geringen Anzahl der DRB4A-Allele unter den RA-Patienten mit einer hohen CRP-Konzentration mit Sicherheitsintervallen von -33 – 85 statistisch nicht signifikant.

4 Diskussion

Bei der Untersuchung der differentiellen Expression von HLA-DRB-Genen im Rahmen dieser Arbeit wurden bekannte Polymorphismen in den Promotorregionen dahingehend analysiert, ob sie von funktioneller Bedeutung sein könnten. Dabei waren die Promotorbereiche des DR53-Locus Gegenstand der Analyse, da sowohl der mit der RA assoziierte Haplotyp DR4 als auch die neutralen Haplotypen DR7 und DR9 von diesem Locus kodiert werden.

4.1 Unterschiedliche transkriptionelle Aktivitäten der Promotoren des DR53-Locus in der THP-1- und in der BJAB-Zelllinie

In Kapitel 3.3 wurde gezeigt, daß Unterschiede zwischen den transkriptionellen Aktivitäten der DR4-, DR7-, DR9-, DRB4A- und DRB4B-Promotoren in den beiden Zelllinien zu verzeichnen sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß in der B-Lymphom-Zelllinie BJAB die DR4-Promotoraktivität am höchsten ist, danach folgen die von DRB4B, DR9 und DR7, die transkriptionelle Aktivität von DRB4A ist am geringsten.

Louis et al. hatten für die B-EBV-Zelllinie BM92 bereits angedeutet, daß die mittels Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT)-Assay ermittelten Promotoraktivitäten von DR4 und DRB4B etwa doppelt so hoch sind wie die von DR7 und DR9 [39]. In einer Studie von Leen und Gorski wurden lediglich die Promotoraktivitäten von DR7 und DRB4A miteinander verglichen [40]. Sie haben mit Hilfe eines CAT-Assays gezeigt, daß die beiden Promotoraktivitäten in der B-Lymphom-Zelllinie RAJI miteinander vergleichbar sind.

Damit entsprechen die Ergebnisse dieser beiden Studien zumindest qualitativ den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Die transkriptionellen Aktivitäten von DR4 und DRB4B sind in BJAB höher als die von DR7, DR9 und DRB4A, wenngleich die Unterschiede in meiner Arbeit nicht so groß sind. Aufgrund der unterschiedlichen Zelllinien, anders gewählten Promotorabschnitten und unterschiedlichen Methoden ist ein Vergleich der Analysen allerdings nur begrenzt möglich.

In der Monozytenzelllinie THP-1 ist die Promotoraktivität von DRB4B am höchsten, darauf folgen die von DR9, DRB4A und DR7, am geringsten ist die Promotoraktivität von DR4. Es gibt dazu keine vergleichbaren Werte in der Literatur. In einer Studie von Leen und Gorski deuteten die Ergebnisse mit mononukleären Zellen des peripheren Blut (PBMC) darauf hin, daß die Aktivität des DRB4B-Promotors höher ist als die des DRB4A-Promotors [22]. In einem RNase-Protection-Assay haben sie gezeigt, daß die prä-mRNA-Konzentration dreifach und die mRNA-Konzentration von DRB4B fünffach

höher sind als die jeweiligen Konzentrationen von DRB4A. Insgesamt variierten die Promotoraktivitäten in der monozytären Zelllinie mehr als in der B-Lymphom-Zelllinie.

4.2 Unterschiedlicher Beitrag der einzelnen Boxen der Promotoren des DR53-Locus an der HLA-DR-Expression

In Kapitel 3.4 wurde mit Hilfe der SPR untersucht, ob die unterschiedlichen Promotoraktivitäten (siehe 3.3) und die unterschiedlichen HLA-DR-Oberflächenexpressionen (siehe 3.2) auf das Bindungsverhalten der Zellkernlysate der zwei Zelllinien an die einzelnen Boxen zurückzuführen ist. Dabei wurde angenommen, daß die spezifische Bindung der Transkriptionsfaktoren an die einzelnen Promotorsequenzen in linearer Beziehung zur transkriptionellen Aktivität steht. Ferner wurde davon ausgegangen, daß sich die Unterschiede zwischen den Promotoraktivitäten auf die jeweiligen HLA-DR-Expressionen auswirken und daß die α -Kette nicht limitierend für die Oberflächenexpression ist.

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Bindungen wären möglicherweise größer, wenn man nicht Zellkernextrakte sondern rekombinante Transkriptionsfaktoren als Analyten bei den Bindungsstudien verwendet hätte. Andere Bestandteile des Zellkernextraktes kompetieren um die Bindung an den Liganden (das Promotor-Oligonukleotid), so daß bei den Bindungsstudien nie eine Sättigung – auch nicht in höheren Konzentrationen – erreicht wurde (Daten nicht gezeigt).

Die Polymorphismen, die hier betrachtet wurden, sind je nach Box unterschiedlich. Es gibt Boxen, die stark konserviert sind, Boxen, innerhalb derer es Substitutionen gibt, aber auch Boxen, bei denen es nur in den flankierenden Bereichen Unterschiede zwischen den Allelen gibt.

Das Modell der differentiellen Expression von HLA-DRB-Genen betrachtet nicht nur den Polymorphismus der kodierenden Gensequenzen sondern darüber hinaus auch den Polymorphismus der regulierenden Gensequenzen, der Promotorsequenzen. Der Polymorphismus ist durch die Polygenie dieses Genortes verstärkt, wobei die Entwicklung eines zweiten funktionellen DRB-Gens in Form von unterschiedlichen allelischen Linien bisher für keinen anderen Locus bekannt ist. Um das Überleben der Art zu gewährleisten, sind vermutlich im Laufe der Evolution unterschiedliche MHC-Moleküle entstanden, die möglichst viele Erreger bei der Immunabwehr erkennen. Indessen könnten unterschiedliche Promotoren durch unterschiedliche Promotoraktivitäten eine differentielle Expression bewirken. Die differentielle Expression könnte man als zusätzliche Flexibilität bei der Immunabwehr verschiedener Erreger betrachten. Damit wird dem in der Evolution entwickelten Polymorphismus der regulierenden Gensequenzen neben dem Polymorphismus der kodierenden

Genesequenzen eine Bedeutung zugeschrieben. Dies trifft möglicherweise auch für andere Gene zu. Erst kürzlich wurde gezeigt, daß eine hirnspezifische differentielle Genexpression möglicherweise den Entwicklungsunterschied zwischen Menschen und Schimpansen ausmacht [41].

Es stellt sich die Frage, ob und wie man die Ergebnisse der Bindungsstudien auf die jeweiligen Promotoraktivitäten beziehen kann. Sobald sich die einzelnen Sequenzen an mehreren Positionen unterscheiden und daraus unterschiedliche Stärken der Bindungen resultieren, ist nicht eindeutig, welche Bindungsaffinitäten zu welchem Anteil in die transkriptionelle Aktivität eingehen. Für die Maus wurde unlängst gezeigt, daß ein einzelner Basenpaaraustausch von A zu G innerhalb der X-Box die Promotoraktivität eines MHC-II-Gens in einer Makrophagenzelllinie senkt [30]. Die Unterschiede zwischen den Promotoraktivitäten werden möglicherweise noch verstärkt, wenn man in Betracht zieht, daß die Unterschiede zwischen den mRNA-Konzentrationen von zwei Promotoren höher sind als die entsprechenden prä-mRNA-Konzentrationen [22]. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß die transkriptionellen Aktivitäten von zwei murinen MHC-II-Allelen, die durch die Aktivitätsbestimmung der Luziferase ermittelt wurden, um einen geringeren Faktor differieren als die entsprechenden Oberflächenexpressionen der MHC-II-Moleküle [30, 31].

Der auffälligste Unterschied zwischen den transkriptionellen Aktivitäten in den beiden Zelllinien ist die achtfach höhere Promotoraktivität von DRB4B im Vergleich zu DRB4A für THP-1, aber nur eine zweifach höhere für BJAB. Der einzige Sequenzunterschied zwischen den beiden DRB4-Promotoren, der das Bindungsverhalten beeinflusst, liegt 3' der TATA-Box. Das mit Hilfe der SPR ermittelte Bindungsverhalten hinsichtlich der beiden verschiedenen TATA-Boxen kann die unterschiedlichen Verhältnisse der Promotoraktivitäten von DRB4B zu -A nicht erklären, da in beiden Fällen die Verhältnisse der Bindungsaffinitäten der Zellkernlysate von THP-1 und BJAB zueinander gleich waren. Daher gibt es vermutlich noch andere, außerhalb des hier betrachteten Promotorbereiches liegende, regulierende Elemente, welche die Transkriptionsrate in beiden Zelllinien unterschiedlich beeinflussen.

Interessanterweise wurden in dieser Arbeit keine großen Unterschiede zwischen den Bindungsaffinitäten der HLA-DRB1-Allele gemessen. Sowohl für die S-Box als auch für die CCAAT-, TATA- und X-Boxen wurden keine deutlichen Unterschiede zwischen den Bindungen an die Zellkernextrakte der beiden Zelllinien detektiert. Die mit dem Luziferase-Assay ermittelten transkriptionellen Aktivitäten von DR4, DR7 und DR9 variieren ebenfalls nicht sehr stark (lediglich die DR4-Promotoraktivität ist in der THP-1-Zelllinie etwa zweifach niedriger als Promotoraktivitäten von der DR7 und DR9). Unterschiedliche Transkriptionsaktivitäten sind auch nicht erwartet worden, da sich die Promotorsequenzen der DRB1-Allele nur geringfügig voneinander unterscheiden.

Dadurch, daß die mit der SPR ermittelten Bindungsaffinitäten der CCAAT- und S-Boxen kaum variieren, scheinen die beiden Boxen keinen Einfluß auf die unterschiedlichen Promotoraktivitäten bzw. die differentielle Expression von HLA-DRB-Genen zu haben.

Bei der Y-Box wurden dagegen deutliche Unterschiede zwischen den Bindungsaffinitäten der Zellkernlysate an die Promotor-Oligonukleotide von DRB1 und DRB4 beobachtet (siehe 3.4.3). Diese Unterschiede sind auf zwei Substitutionen innerhalb der Y-Box zurückzuführen. Interessanterweise besitzen die DRB4-Promotorsequenzen der Y-Box eine Substitution, welche die Affinität zum NF-Y und anderer redoxabhängiger Transkriptionsfaktoren senkt [42]. Auf der anderen Seite scheint die Substitution 5' der Y-Box, die einen der zwei Unterschiede zwischen DRB4A und -B darstellt, für das Bindungsverhalten der THP-1- und BJAB-Zellkernlysate unerheblich zu sein, da die gemessenen relativen Bindungsaffinitäten nur geringfügig voneinander abweichen. In der Literatur wird die Region 5' der Y-Box für DRA als B-Cell factor-1 (BCF-1)-Element beschrieben [43]. Unterschiede in diesem Element scheinen hier jedoch das Bindungsverhalten an die Y-Box nicht zu beeinflussen. Daher beruhen die gemessenen Unterschiede zwischen den Promotoraktivitäten von DRB4A und -B vermutlich nicht auf der Y-Box.

4.2.1 Feinregulation der DRB4A- und DRB4B-Expression durch die TATA-Box

Besonders hervorzuheben ist das Bindungsverhalten der Zellkernextrakte beider Zelllinien an die ubiquitäre TATA-Box. Hier zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den DRB4A- und -B-Promotoren. Einerseits war die gemessene Differenz in beiden Zelllinien die höchste Differenz, die überhaupt für die DRB-Promotoren aller Boxen zu verzeichnen war. Andererseits scheint dieser etwa zweifache Unterschied - relativ gesehen - gering zu sein. Durch die Kompetitionsanalyse mittels EMSA wurde die höhere Bindungsaffinität zur TATA-Box von DRB4B allerdings mit einer anderen Methode bestätigt. Die stärkere Bindung der Zellkernextrakte an das DRB4B-Oligonukleotid der TATA-Box scheint damit ursächlich im Basenpaaraustausch 3' der TATA-Box zu liegen. Dieser Basenpaaraustausch ist neben dem 5' der Y-Box (siehe 3.4.4) der einzige, der die Promotorsequenzen von DRB4A und -B unterscheidet. Somit ist es höchstwahrscheinlich, daß die höhere transkriptionelle Aktivität des DRB4B-Promotors, die in Kapitel 3.3 bestimmt wurde, auf diesen einzelnen Basenpaaraustausch zurückzuführen ist. Die differentielle Expression von DRB4A und -B wird damit vermutlich über die ubiquitäre TATA-Box und nicht über die HLA-II-spezifische X-Box und CIITA reguliert.

4.2.2 Differentielle Expression in den Monozyten wird durch die X-Box vermittelt

Die Untersuchung des Bindungsverhaltens der für die HLA-II-Promotoren spezifischen X-Box ergab, daß sowohl die Zellkernextrakte der Monozyten-Zelllinie als auch die der B-Lymphom-Zelllinie deutlich besser an die Promotor-Oligonukleotide von DRA binden als an die von DRB. Darüber hinaus lassen sich alle Bindungsaffinitäten durch die Stimulation mit INF- γ im Falle von THP-1 deutlich und im Falle von BJAB nur etwas steigern.

In bezug auf den Vergleich von DRA mit DRB wurde bereits von Louis et al. angedeutet, daß die durch einen CAT-Assay bestimmte Promotoraktivität von DRA vierfach höher ist als die von DR4, bzw. achtfach höher als die von DR7 und DR9 [39]. Eine Kompetitionsanalyse mittels EMSA von Louis-Plence et al. hatte ergeben, daß die Transkriptionsfaktoren, die an die X-Box binden, die höchste relative Bindungsaffinität zu der X-Box von DRA haben. Die relative Bindungsaffinität zur X-Box von DRB war hingegen am geringsten, geringer sogar als die zur X-Box von DPA, DQB, DQA oder DPB [44]. Somit entsprechen die in dieser Dissertation gemessenen Daten der Auffassung, daß die HLA-II-Expression über die Locus-spezifische X-Box, die mit dem RFX-Komplex und dem CIITA interagiert, reguliert wird [14]. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, daß die DRA-Expression der reglementierende Schritt bei der HLA-DR-Oberflächenexpression ist [39], da sich die Bindungsaffinität der THP-1-Zellkernextrakte an die X-Box-Sequenz von DRA durch die Stimulation am stärksten steigern ließ.

Durch die Gabe von INF- γ wurde die Oberflächenexpression von HLA-DR-Molekülen in den monozytären Zellen deutlich verstärkt (siehe 3.2). Dies spiegelte sich auch bei der Bindungsaffinitäten der Zellkernextrakte an die X-Box wider, die durch die Stimulation mit INF- γ ebenfalls erhöht wurden. Eine Stimulation mit den anderen Substanzen führte weder zu einer Erhöhung der HLA-DR-Oberflächenexpression noch zu einem deutlichen Anstieg der Bindungsaffinitäten. Die INF- γ -Stimulation der HLA-DR-Expression wird nach den Ergebnissen dieser Arbeit vermutlich über die X-Box vermittelt. Gleiches gilt für die HLA-DR-Oberflächenexpression in der Zelllinie BJAB, bei der lediglich die mittlere Fluoreszenzintensität der zu 100% HLA-DR-positiven Zellen etwas zunimmt. Entsprechend wurden hier die insgesamt höheren Bindungsaffinitäten der BJAB-Zellkernextrakte an die einzelnen Promotor-Oligonukleotide durch die Stimulation mit INF- γ nur im geringen Ausmaße erhöht. Darüber hinaus zeigte sich auch für die BJAB-Zelllinie, daß eine Stimulation mit weiteren Substanzen weder die HLA-DR-Oberflächenexpression noch das Bindungsverhalten der Zellkernlysate wesentlich beeinflußt.

Das Unvermögen der BJAB-Zelllinie zur deutlichen Erhöhung der HLA-DR-Oberflächenexpression stimmt mit den Ergebnissen von Czerwony et al. überein, bei denen sich humane B-Lymphozyten des peripheren Bluts nicht mit LPS/PMA stimulieren ließen [32]. Die B-Zellen als ein Vertreter der APC scheinen daher unempfindlich für eine differentielle Expression von HLA-DRB-Genen zu sein. Dagegen kommt vermutlich den Monozyten – den Ergebnissen mit der THP-1-Zelllinie nach zu urteilen – eine weit wichtigere Rolle bei der differentiellen Expression zu. Sie reagieren auf eine Stimulation mit einer unterschiedlichen HLA-DR-Expression, die sich möglicherweise auch auf das Th1/Th2-Gleichgewicht auswirkt.

Für das murine System wurde bereits gezeigt, daß eine differentielle Expression von MHC-II-Genen auf die Makrophagen beschränkt ist und sich auch auf die Zytokinproduktion der T-Zellen auswirkt [31]. Eine hohe MHC-II-Expression der Makrophagen regte die T-Zellen in deren Gegenwart zur Ausschüttung von Zytokinen an, die eine Th1-Antwort begünstigen. Im Gegensatz dazu führte eine geringere MHC-II-Expression der Makrophagen zu einer vermehrten Produktion Th2-spezifischer Zytokine der T-Zellen. Die Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes durch die differentielle Expression der Monozyten könnte sich somit auf die Empfindlichkeit gegenüber der RA auswirken.

4.3 Einfluß der differentiellen Expression von HLA-DRB-Genen auf die Schwere des Krankheitsverlaufes der RA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde beschrieben, daß der DR7-Haplotyp bevorzugt sowohl mit dem DRB4B-Promotor als auch mit der DRB4-Spleißvariante assoziiert ist (siehe 3.1). Zu den Häufigkeiten der DRB4-Spleißvariante unter DRB4-positiven Individuen gab es bisher keine Zahlen, wohl aber zur Verteilung des DRB4B-Promotors. In einer japanischen Studie wurde für eine japanische Population beschrieben, daß 2 von 86 DR4-positiven Allelen (2%) bzw. 1 von 42 DR9-positiven Allelen (3%) mit dem DRB4-Gen assoziiert waren [45]. Hingegen waren 2 von 5 DR7-positiven Allelen (40%) mit dem DRB4B-Promotor assoziiert. Es ist bemerkenswert, daß in der japanischen Population im Gegensatz zu der hier betrachteten Population kaukasischen Ursprungs der DR9-Haplotyp aufgrund des anderen ethnischen Hintergrunds wesentlich häufiger auftritt als der DR7-Haplotyp. Nichtsdestotrotz bestätigt sich, daß der DRB4B-Promotor bevorzugt mit dem DR7-Haplotypen assoziiert ist, wenngleich die Anzahl der betrachteten Allele mit 5 sehr niedrig ist.

Das gehäufte Auftreten des DRB4B-Promotors und der DRB4-Spleißvariante unter DR7-positiven Individuen hat für die HLA-DR-Expression zwei gegensätzliche Konsequenzen zur Folge. Zum einen bedeutet das Tragen der DRB4-Spleißvariante, daß es durch die Mutation an der Spleißerkennungssequenz zu keiner DRB4-Expression

kommt. Daraus folgt, daß die gesamte HLA-DR-Expression eines Chromosoms nur auf das DRB1-Gen zurückzuführen ist. Das häufigere Auftreten des DRB4B-Promotors im Vergleich zum DRB4A-Promotor bedeutet zum anderen, daß die DRB4-Expression bei DR7-positiven Individuen höher ist, wenn man unterstellt, daß sich die transkriptionellen Aktivitäten auch auf die entsprechenden HLA-DR-Expressionen auswirken. Es wurde in dieser Arbeit beschrieben, daß die transkriptionellen Aktivitäten des DRB4B-Promotors sowohl in der Monozytenzelllinie THP-1 als auch in der B-Lymphom-Zelllinie BJAB höher sind als die des DRB4A-Promotors (siehe 3.3). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich DR7-positive Individuen sowohl durch eine erhöhte DRB4-Expression (DRB4B-Promotor) als auch durch eine geringere DRB4-Expression auszeichnen (DRB4-Spleißvariante). Die Häufigkeiten der Assoziation mit dem DRB4B-Promotor und mit der DRB4-Spleißvariante sind aber sowohl in der Gruppe der RA-Patienten als auch in der der Kontrollen gleich verteilt (siehe 3.1). Daraus kann man schließen, daß die unterschiedliche Expression des DRB4-Gens zumindest nach dieser Studie keinen Einfluß auf die Empfänglichkeit gegenüber der RA hat.

Jedoch deuten die Ergebnisse in Kapitel 3.5 darauf hin, daß eine erhöhte HLA-DR-Expression mit der Schwere des Krankheitsverlaufes der RA korreliert. Unter den RA-Patienten mit einer höheren CRP-Konzentration im Serum war die Häufigkeit des DRB4B-Promotors, der eine höhere transkriptionelle Aktivität als der DRB4A-Promotor besitzt, statistisch signifikant erhöht. Weiterhin war das Auftreten der DRB4-Spleißvariante, welche eine DRB4-Expression verhindert, unter den RA-Patienten mit einer höheren CRP-Konzentration geringer. Dennoch war dieses zweite Ergebnis aufgrund der geringen Anzahl der betrachteten Allele statistisch nicht signifikant.

Interessanterweise gab es keinen deutlichen Unterschied zwischen den Häufigkeiten der HLA-DRB1*04-, -*07- und -*09-Allele in den beiden Patientengruppen. Da die hier untersuchte RA-Kohorte jedoch eine statistisch signifikante Assoziation mit dem Haplotyp HLA-DRB1*04 zeigt, scheint das gemeinsame Epitop („shared epitope“) keinen Einfluß auf die Schwere des Krankheitsverlaufes zu haben. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die differentielle Expression von HLA-DRB-Genen des DR53-Locus keinen Einfluß auf die Empfänglichkeit gegenüber der RA hat, wohl aber einen Einfluß auf den Krankheitsverlauf der RA.

In dieser Arbeit wurde für die Untersuchung der differentiellen Expression von HLA-DRB-Genen in zwei verschiedenen APC die monozytäre Zelllinie THP-1 und die B-Lymphom-Zelllinie BJAB gewählt. Es bleibt zu klären, inwiefern auch andere Zelltypen eine differentielle Expression aufweisen. Zum einen wären die dendritischen Zellen als dritter Vertreter der APC interessant. Zum anderen findet man auch HLA-DR-positive Zellen in der Gelenkhaut (Synoviozyten) bei RA-Patienten (siehe 1.3.2). Eine

differentielle HLA-DR-Expression dieser Zellen könnte sich möglicherweise auf die Immunantwort (und deren Polarisierung) auswirken und Hinweise für die Empfänglichkeit gegenüber der RA oder für den Verlauf der Erkrankung geben.

5 Zusammenfassung

Die wichtigste genetische Ursache von rheumatoider Arthritis (RA) wird in den humanen Leukozyten-Antigenen (HLA) gesehen. Die RA ist vor allem mit dem Haplotypen HLA-DRB1*04 (DR4) assoziiert. Es wurden bisher mehrere Mechanismen beschrieben, wie diese HLA-DR-Moleküle die Entstehung und den Verlauf der Erkrankung beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die differentielle Expression von HLA-DRB-Genen in unterschiedlichen Antigen-präsentierenden Zellen als möglicher Mechanismus untersucht. Dabei wurden strukturelle Unterschiede zwischen den Promotoren des krankheitsassoziierten DR4-Haplotyps und den neutralen Haplotypen DR7 und DR9 eingehender betrachtet. Allen drei Haplotypen ist gemein, daß sie das DRB4-Gen als zweites funktionelles, gering-polymorphes DRB-Gen tragen, wobei das DRB4-Gen entweder den DRB4A oder den -B-Promotor besitzt. Über die Bestimmung der Luziferaseaktivität wurden die transkriptionellen Aktivitäten der fünf verschiedenen Promotoren DR4, DR7, DR9, DRB4A und DRB4B in der humanen Monozytenzelllinie THP-1 und in der humanen B-Lymphom-Zelllinie BJAB ermittelt. Es zeigte sich, daß in beiden Zelllinien die Promotoraktivität von DRB4B höher war als die von DRB4A. Um den Einfluß der einzelnen Promotorelemente auf die unterschiedlichen Transkriptionsaktivitäten näher zu untersuchen, wurde mit Hilfe der surface plasmon resonance (SPR) die Bindung der Transkriptionsfaktoren aus den Zellkernlysaten von THP-1 und BJAB an die unterschiedlichen S-, X-, Y-, CCAAT- und TATA-Boxen analysiert. Als unerwartetes Ergebnis konnte gezeigt werden, daß die unterschiedliche Expression von DRB4A und DRB4B durch die ubiquitäre TATA-Box vermittelt wird. Erwartungsgemäß hingegen wurde die INF- γ -Stimulation der HLA-DR-Expression von THP-1- aber auch von BJAB-Zellen durch die für die HLA-II-Promotoren spezifische X-Box vermittelt. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der Haplotyp DR7 bevorzugt mit dem DRB4B-Promotor, der eine höhere transkriptionelle Aktivität als der DRB4A-Promotor besitzt, und mit der DRB4-Spleißvariante, die eine DRB4-Expression verhindert, assoziiert ist. Da die beiden Häufigkeiten unter den RA-Patienten und den Kontrollen gleich waren, kann ein Einfluß der HLA-DR-Expression auf die Empfänglichkeit gegenüber der RA ausgeschlossen werden. Bei der Analyse einer bereits gut charakterisierten RA-Kohorte stellte sich allerdings heraus, daß der DRB4B-Promotor mit einem schweren und die DRB4-Spleißvariante mit einem milden Krankheitsverlauf assoziiert ist, so daß eine erhöhte HLA-DR-Expression den Krankheitsverlauf negativ zu beeinflussen scheint. Möglicherweise spielt der Polymorphismus der regulierenden Gensequenzen neben dem Polymorphismus der kodierenden Gensequenzen auch für andere Gene eine wichtigere Rolle als bisher angenommen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M. und Capra, J. D. (1999): Immunobiology: the immune system in health and disease, 4th Edition. Auflage, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, New York.
- [2] Rammensee, H. G. (1996): Antigen presentation--recent developments, *Int Arch Allergy Immunol* 110 [4], Seite 299-307. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=8768795>
- [3] Rao, A. und Avni, O. (2000): Molecular aspects of T-cell differentiation, *Br Med Bull* 56 [4], Seite 969-84. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11359632>
- [4] Nossal, G. J. (1994): Negative selection of lymphocytes, *Cell* 76 [2], Seite 229-39. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=8293461>
- [5] Heard, R. (1994): HLA and autoimmune disease, HLA and disease, Academic Press Ltd, London.
- [6] Lang, B.; Melchers, I.; Urlacher, A.; Tanzi-Fetta, R. F.; Kohlbrenner, S.; Tongio, M. M. und Peter, H. H. (1990): HLA-DR1 and DRw6 association in DR4-negative rheumatoid arthritis patients, *Rheumatol Int* 10 [4], Seite 171-5.
- [7] Weyand, C. M.; McCarthy, T. G. und Goronzy, J. J. (1995): Correlation between disease phenotype and genetic heterogeneity in rheumatoid arthritis, *J Clin Invest* 95 [5], Seite 2120-6.
- [8] Listing, J.; Rau, R.; Muller, B.; Alten, R.; Gromnica-Ihle, E.; Hagemann, D. und Zink, A. (2000): HLA-DRB1 genes, rheumatoid factor, and elevated C-reactive protein: independent risk factors of radiographic progression in early rheumatoid arthritis. Berlin Collaborating Rheumatological Study Group, *J Rheumatol* 27 [9], Seite 2100-9.
- [9] Gerok, W.; Huber, C.; Meinertz, T. und Zeidler, H. (2000): Die innere Medizin, Schattauer Verlag, Stuttgart.
- [10] Feldmann, M.; Brennan, F. M. und Maini, R. N. (1996): Role of cytokines in rheumatoid arthritis, *Annu Rev Immunol* 14, Seite 397-440. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=8717520>

- [11] Weyand, C. M. und Goronzy, J. J. (1997): Pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Med Clin North Am* 81 [1], Seite 29-55. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9012754>
- [12] Weyand, C. M.; Hicok, K. C.; Conn, D. L. und Goronzy, J. J. (1992): The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis, *Ann Intern Med* 117 [10], Seite 801-6.
- [13] Marsh, S. G.; Bodmer, J. G.; Albert, E. D.; Bodmer, W. F.; Bontrop, R. E.; Dupont, B.; Erlich, H. A.; Hansen, J. A.; Mach, B.; Mayr, W. R.; Parham, P.; Petersdorf, E. W.; Sasazuki, T.; Schreuder, G. M.; Strominger, J. L.; Svejgaard, A. und Terasaki, P. I. (2001): Nomenclature for factors of the HLA system, 2000, *Hum Immunol* 62 [4], Seite 419-68.
- [14] Mach, B.; Steimle, V.; Martinez-Soria, E. und Reith, W. (1996): Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease, *Annu Rev Immunol* 14, Seite 301-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmim%3ffield=medline_uid&search=8717517
- [15] Benoist, C. und Mathis, D. (1990): Regulation of major histocompatibility complex class-II genes: X, Y and other letters of the alphabet, *Annu Rev Immunol* 8, Seite 681-715.
- [16] Tsang, S. Y.; Nakanishi, M. und Peterlin, B. M. (1990): Mutational analysis of the DRA promoter: cis-acting sequences and trans- acting factors, *Mol Cell Biol* 10 [2], Seite 711-9.
- [17] Jabrane-Ferrat, N.; Fontes, J. D.; Boss, J. M. und Peterlin, B. M. (1996): Complex architecture of major histocompatibility complex class II promoters: reiterated motifs and conserved protein-protein interactions, *Mol Cell Biol* 16 [9], Seite 4683-90.
- [18] Buratowski, S.; Hahn, S.; Guarente, L. und Sharp, P. A. (1989): Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II, *Cell* 56 [4], Seite 549-61.
- [19] Van Dyke, M. W.; Sawadogo, M. und Roeder, R. G. (1989): Stability of transcription complexes on class II genes, *Mol Cell Biol* 9 [1], Seite 342-4.
- [20] Louis, P.; Eliaou, J. F.; Kerlan-Candon, S.; Pinet, V.; Vincent, R. und Clot, J. (1993): Polymorphism in the regulatory region of HLA-DRB genes correlating with haplotype evolution, *Immunogenetics* 38 [1], Seite 21-6.

- [21] Sutton, V. R.; Kienzle, B. K. und Knowles, R. W. (1989): An altered splice site is found in the DRB4 gene that is not expressed in HLA-DR7,Dw11 individuals, *Immunogenetics* 29 [5], Seite 317-22.
- [22] Leen, M. P. und Gorski, J. (1997): DRB4 promoter polymorphism in DR7 individuals: correlation with DRB4 pre-mRNA and mRNA levels, *Immunogenetics* 45 [6], Seite 371-8.
- [23] Voorter, C. E.; Lardy, N. M. und van den Berg-Loonen, E. M. (2000): Presence of the DRB4*0103102N null allele in different DRB1*04-positive individuals, *Tissue Antigens* 55 [1], Seite 37-43.
- [24] Cowell, L. G.; Kepler, T. B.; Janitz, M.; Lauster, R. und Mitchison, N. A. (1998): The distribution of variation in regulatory gene segments, as present in MHC class II promoters, *Genome Res* 8 [2], Seite 124-34. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.genome.org/cgi/content/full/8/2/124>
- [25] Mitchison, N. A. (2001): Genetic variation in the MHC II promoter: lessons for regulation and for comparative genomics, *Folia Biol* 47 [6], Seite 183-6. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11768774>
- [26] Guardiola, J.; Maffei, A.; Lauster, R.; Mitchison, N. A.; Accolla, R. S. und Sartoris, S. (1996): Functional significance of polymorphism among MHC class II gene promoters, *Tissue Antigens* 48 [6], Seite 615-25.
- [27] Gregersen, P. K.; Silver, J. und Winchester, R. J. (1987): The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 30 [11], Seite 1205-13.
- [28] Hall, F. C.; Weeks, D. E.; Camilleri, J. P.; Williams, L. A.; Amos, N.; Darke, C.; Gibson, K.; Pile, K.; Wordsworth, B. P. und Jessop, J. D. (1996): Influence of the HLA-DRB1 locus on susceptibility and severity in rheumatoid arthritis, *Qjm* 89 [11], Seite 821-9.
- [29] Muller, B.; Gimsa, U.; Mitchison, N. A.; Radbruch, A.; Sieper, J. und Yin, Z. (1998): Modulating the Th1/Th2 balance in inflammatory arthritis, *Springer Semin Immunopathol* 20 [1-2], Seite 181-96. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=9836376>

- [30] Janitz, M.; Mitchison, A.; Reiners-Schramm, L. und Lauster, R. (1997): Polymorphic MHC class II promoters exhibit distinct expression pattern in various antigen-presenting cell lines, *Tissue Antigens* 49 [2], Seite 99-106.
- [31] Baumgart, M.; Moos, V.; Schuhbauer, D. und Muller, B. (1998): Differential expression of major histocompatibility complex class II genes on murine macrophages associated with T cell cytokine profile and protective/suppressive effects, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [12], Seite 6936-40. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.pnas.org/cgi/content/full/95/12/6936>
<http://www.pnas.org/cgi/content/full/95/12/6936>
- [32] Czerwony, G.; Alten, R.; Gromnica-Ihle, E.; Hagemann, D.; Reuter, U.; Sorensen, H. und Muller, B. (1999): Differential surface expression of HLA-DRB1 and HLA-DRB4 among peripheral blood cells of DR4 positive individuals, *Hum Immunol* 60 [1], Seite 1-9.
- [33] Teyton, L.; Lotteau, V.; Turmel, P.; Arenzana-Seisdedos, F.; Virelizier, J. L.; Pujol, J. P.; Loyau, G.; Piatier-Tonneau, D.; Auffray, C. und Charron, D. J. (1987): HLA DR, DQ, and DP antigen expression in rheumatoid synovial cells: a biochemical and quantitative study, *J Immunol* 138 [6], Seite 1730-8. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=3102596>
- [34] Eliaou, J. F.; Andary, M.; Favier, F.; Carayon, P.; Poncelet, P.; Sany, J.; Brochier, J. und Clot, J. (1988): Increase of class II HLA molecules on the membrane of B lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis, *Autoimmunity* 1 [3], Seite 217-22.
- [35] Kerlan-Candon, S.; Louis-Plence, P.; Wiedemann, A.; Combe, B.; Clot, J.; Eliaou, J. F. und Pinet, V. (2001): Specific overexpression of rheumatoid arthritis-associated HLA-DR alleles and presentation of low-affinity peptides, *Arthritis Rheum* 44 [6], Seite 1281-92.
- [36] Sykes, B. C. (1983): DNA in heritable disease, *Lancet* 2 [8353], Seite 787-8.
- [37] Scharf, S. J.; Griffith, R. L. und Erlich, H. A. (1991): Rapid typing of DNA sequence polymorphism at the HLA-DRB1 locus using the polymerase chain reaction and nonradioactive oligonucleotide probes, *Hum Immunol* 30 [3], Seite 190-201.

- [38] Glimcher, L. H. und Kara, C. J. (1992): Sequences and factors: a guide to MHC class-II transcription, *Annu Rev Immunol* 10, Seite 13-49.
- [39] Louis, P.; Vincent, R.; Cavadore, P.; Clot, J. und Eliaou, J. F. (1994): Differential transcriptional activities of HLA-DR genes in the various haplotypes, *J Immunol* 153 [11], Seite 5059-67.
- [40] Leen, M. P. und Gorski, J. (1996): Differential expression of isomorphic HLA-DR beta genes is not a sole function of transcription, *Hum Immunol* 50 [2], Seite 111-20.
- [41] Enard, W.; Khaitovich, P.; Klose, J.; Zöllner, S.; Heissig, F. und Pääbo, S. (2002): Intra- and Interspecific Variation in Primate Gene Expression Patterns, *Science* 296 [5565], Seite 340-3.
- [42] Duh, J. L.; Zhu, H.; Shertzer, H. G.; Nebert, D. W. und Puga, A. (1995): The Y-box motif mediates redox-dependent transcriptional activation in mouse cells, *J Biol Chem* 270 [51], Seite 30499-507. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jbc.org/cgi/content/full/270/51/30499>
- [43] Voliva, C. F.; Aronheim, A.; Walker, M. D. und Peterlin, B. M. (1992): B-cell factor 1 is required for optimal expression of the DRA promoter in B cells, *Mol Cell Biol* 12 [5], Seite 2383-90.
- [44] Louis-Plence, P.; Moreno, C. S. und Boss, J. M. (1997): Formation of a regulatory factor X/X2 box-binding protein/nuclear factor-Y multiprotein complex on the conserved regulatory regions of HLA class II genes, *J Immunol* 159 [8], Seite 3899-909. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://www.jimmunol.org/cgi-bin/Retreiver.cgi/v159n8/3899/3899-abs-frame.html>
- [45] Naruse, T. K.; Ando, R.; Nose, Y.; Kagiya, M.; Ando, H.; Kawata, H.; Nabeya, N.; Isshiki, G. und Inoko, H. (1997): HLA-DRB4 genotyping by PCR-RFLP: diversity in the associations between HLA-DRB4 and DRB1 alleles, *Tissue Antigens* 49 [2], Seite 152-9.

7 Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei PD Dr. Brigitte Müller und Prof. Dr. Andreas Radbruch bedanken, die es mir ermöglicht haben, am DRFZ diese Dissertation anzufertigen. Darüber hinaus bin ich Prof. Dr. Wolfgang Lockau für die bereitwillige Übernahme der Begutachtung außerordentlich dankbar.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des DRFZ danken, die zur angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben, darunter vor allem der Müller-Gruppe, bestehend aus Bianka, Rainer, Kai, Jill, Miro, Katrin, Sandra sowie Katharina und Verena, aber auch der Lauster-Gruppe, insbesondere Roland, Mark und Luzie. Selbstverständlich danke ich auch Osman und Franca, die mir die Bindungsexperimente näher gebracht haben.

Mein persönlicher Dank gilt Bernhard, meiner Mutter und meinem Vater – aber auch Hans, der das Ende der Promotion leider nicht mehr erleben durfte – und Maria sowie meinen Freunden, insbesondere Peter und Martin, die mich alle unterstützt und ermutigt haben.

Lebenslauf

28.06.1970 geboren in Bremen

Schulbildung

1976-1980 Grundschule an der Karlstraße, Achim

1980-1982 Orientierungsstufe am Markt, Achim

1982-1989 Gymnasium Achim

08.05.1989 Abitur

1989-1990 Wehrdienst

Studium

1990-1996 Studium der Wirtschaftswissenschaften an der Carl-von-Ossietzky-Universität in Oldenburg

1992-1993 Studienaufenthalt an der University of Wyoming, Laramie, USA

1994-1995 Studienaufenthalt an der Université du Havre, Frankreich

27.06.1996 Abschluß als Diplom-Ökonom (Thema der Diplomarbeit: „Zukunftsfähiges Deutschland - Implikationen für die Beschäftigung“)

1996-1999 Studium der Biochemie an der Freien Universität Berlin

05.05.1999 Abschluß als Diplom-Biochemiker (Thema der Diplomarbeit: „Charakterisierung β_2 -Integrin vermittelter Signalprozesse in monozytären Leukämiezellen“)

Promotion

07.06.1999 Beginn der Promotionsarbeit am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum, Berlin

Berlin, 16.04.02

Christian Heldt

Publikationsliste

Wissenschaftliche Publikation:

Heldt C, Müller B: Differential Expression of HLA II Genes Associated with Disease Progression in Rheumatoid Arthritis. In Vorbereitung

Poster und Vorträge:

2nd Joint Meeting Signal Transduction in Langen, 19.11. – 21.11.1998

Antisense CD11b integrin inhibits the development of a differentiated monocytic phenotype in myeloid cells (Christian Heldt / Ralf Hass, Berlin)

Institut für Zellbiologie und Immunologie (IZI) an der Universität Stuttgart, 04.03.1999

Antisense CD11b integrin inhibits the development of a differentiated monocytic phenotype in myeloid cells (Christian Heldt / Ralf Hass, Berlin)

23. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie in Rostock, 14.03. – 18.03.1999

Phorbol ester-induced differentiation of human myeloid leukemia cells is inhibited by antisense CD11b integrin expression (Christian Heldt / Ralf Hass, Berlin)

Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, 13.03. – 16.03.2002

Differential expression of DRB genes (Christian Heldt / Brigitte Müller-Hilke, Berlin)

Berlin, 16.04.02

Christian Heldt

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Verwendung anderer Hilfsmittel und Hilfen als die in der Arbeit angegebenen verfaßt habe.

Berlin, 16.04.02

Christian Heldt